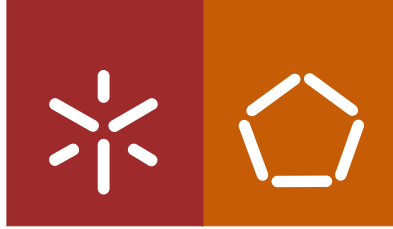


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Joana Vanessa Santos dos Reis

Análise de sinais neuronais de roedores em movimento livre num estudo sobre stress crónico



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Joana Vanessa Santos dos Reis

Análise de sinais neuronais de roedores em movimento livre num estudo sobre stress crónico

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

Trabalho realizado sob a orientação do
Professor Doutor José Higinio Gomes Correia
e do
Professor Doutor Nuno Dias

Outubro de 2011

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ____/____/____

Assinatura: _____

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA
EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO
INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE
Universidade do Minho, ____/____/____ Assinatura:

Aos meus Pais e aos meus irmãos,

AGRADECIMENTOS

“We know the human brain is a device to keep the ears from grating on one another.”
Peter de Vries (from *Comfort Me with Apples*)

Agradeço em primeiro lugar aos meus orientadores, Prof. Higinio Correia e Prof. Nuno Dias pela orientação e disponibilidade durante a realização da presente tese de mestrado.

Agradeço ao Prof. Nuno Sousa e a todos os colegas e funcionários do ICVS (Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde) da Escola de Ciências da Saúde da Universidade do Minho.

Um especial agradecimento ao Luis Jacinto que acompanhou e guiou de perto todas as fases do meu trabalho.

Agradeço a todo o pessoal do *Instituto de Bioingeniería na Universidad Miguel Hernández de Elche* onde passei o primeiro semestre deste ano.

Agradeço aos meus pais, aos meus irmãos e a toda a minha família pelo incentivo e apoio incondicional, sem eles não teria sido possível. Agradeço aos meus amigos que estiveram sempre lá para mim e incentivaram o meu sucesso. Por fim mas não menos importante agradeço ao meu namorado, Mário, por todo amor, carinho e o apoio dados nesta fase tão importante da minha vida académica.

SUMÁRIO

Os testes de comportamento com animais são uma ferramenta amplamente utilizada na área das neurociências. A análise integrada dos dados de comportamento com os sinais electrofisiológicos é uma mais valia, todavia, não existe nenhum *software* (quer comercial quer livre) que efectue integradamente esta análise.

A principal contribuição desta dissertação foi o desenvolvimento de uma ferramenta de análise de dados para aplicação em testes de comportamento de forma integrada com os dados electrofisiológicos. Esta ferramenta foi validada utilizando os dados electrofisiológicos e comportamentais adquiridos de ratos adultos num estudo sobre stress crónico. Este estudo procura compreender as implicações electrofisiológicas e comportamentais do stress crónico.

A ferramenta informática permite efectuar diversas funções de segmentação de forma a analisar os sinais electrofisiológicos durante períodos relevantes. Para a condição basal foi desenvolvido um algoritmo que segmenta os períodos em que o animal se desloca com velocidade constante, nos teste de comportamento a segmentação foi efectuada de acordo com a posição do animal no teste. Este *software* permite também uma análise automática dos dados de comportamento segundo os factores tipicamente estudados, ou seja, o número de cruzamentos e o tempo despendido dentro de cada região. O teste estatístico *t-student* avaliou as diferenças ao nível dos dados electrofisiológicos e de comportamento entre o grupo de stress e de controlo.

Em geral, a segmentação automática apresenta resultados bons, sendo as diversas regiões de cada teste correctamente marcadas. Como consequência, espera-se que os dados de comportamento também sejam correctos. Na segmentação aplicada à condição basal os resultados foram piores. Os dados de comportamento não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos. Ao nível electrofisiológico os resultados revelaram um aumento da potência e coerência do grupo de stress em relação ao grupo de controlo. Este aumento é mais marcado nas regiões do PFC (córtex pré-frontal) e dHPC (hipocampo dorsal). No entanto, estes resultados devem ser analisados com cuidado uma vez que o número dos animais é reduzido.

ABSTRACT

Behavior tests are a largely used tool in neuroscience experimentations with animals. An integrated analysis of behavior and electrophysiological data would be very useful. However, there is no software available for such propose.

The major goal of this project was a tool development for analyzing the behavior and electrophysiological data in an integrated way. The data were recorded in behavior tests and also in basal condition (in a familiar arena). This tool was validated using data from a chronicle stress study in free moving rodents. The goal of this study the goal is to report the electrophysiological changes due to chronicle stress as well as the behavior implications.

The developed tool provides a variety of functions for doing the analysis of electrophysiological in specific regions of the tests. An algorithm based on velocity and distance was implemented for the basal condition.

This tool makes possible the a automatic behavior analysis of the OF (Open Field) and the EPM (Elevated Plus Maze) based on the time spend in each area and number of entries/ crosses within it. The electrophysiological and behavior differences between the two groups were analyzed using the t-student statistical test for independent samples.

In general, automatic segmentation showed good results. The different areas were correctly marked, in both EPM and OF. Although, the algorithm implemented for basal condition have bad results, with percentages of nearly 50% of wrong segments selected.

The behavior data doesn't show statistically significant differences between the tow groups of animals. Regarding to the electrophysiological data, the results revealed an increase of power and coherence between the PFC (pre-frontal cortex) and the dHPC (dorsal hippocampus) in the lower frequencies (theta and alpha bands). These results must be analyzed carefully because the used number of animals was very small. A higher number of animals is expected to be use in future experiments.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	V
SUMÁRIO	VII
INTRODUÇÃO	1
1.1) INTRODUÇÃO GERAL	1
1.2) MOTIVAÇÃO	2
1.3) ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	4
FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
2.1) FUNDAMENTOS DE NEUROCIÊNCIAS	5
2.1.1) OS NEURÓNIOS	5
2.1.2) OS POTENCIAIS DE ACÇÃO	8
2.1.3) OS <i>LOCAL FIELD POTENTIALS</i> (LFP's)	9
2.1.4) O CÉREBRO E O COMPORTAMENTO	11
2.2) O STRESS E O CÉREBRO	14
2.2.1) IMPACTO DO STRESS CRÓNICO NA LIGAÇÃO HPC-PFC	15
2.2.2) MODULAÇÃO DO COMPORTAMENTO EM AMBIENTES STRESSANTES	16
2.2.3) PROTOCOLO DE STRESS	17
2.2.4) OS TESTES DE COMPORTAMENTO	18
2.3) ANÁLISE DE SINAIS NEURONAIS	23
2.3.1) O ESPECTRO DE FREQUÊNCIAS (ANÁLISE DE <i>FOURIER</i>)	23
2.3.2) COERÊNCIA ENTRE SINAIS	29
MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1) O PROTOCOLO DE GRAVAÇÕES	32
3.2) O SISTEMA DE AQUISIÇÃO DO SINAL	33
3.2.1) OS IMPLANTES	35
3.3) O SISTEMA DE SEGMENTAÇÃO DO SINAL	35
3.3.1) MANUAL	35
3.3.2) AUTOMÁTICA	36
3.4) ANÁLISE NEURONAL	45
3.4.1) CÁLCULO DO ESPECTRO DE POTÊNCIAS DO SINAL	45
3.4.2) CÁLCULO DE COERÊNCIAS ENTRE REGIÕES CEREBRAIS	46
3.5) ESTATÍSTICA	47
3.6) INTERFACE COM O UTILIZADOR	48
RESULTADOS	49
4.1) ACTIVIDADE BASAL	51
4.1.1) RESULTADOS OBTIDOS COM A IMPLEMENTAÇÃO DO ALGORITMO DE SEGMENTAÇÃO AUTOMÁTICA	51
4.1.2) ANÁLISE NEURONAL A PARTIR DE SEGMENTAÇÃO MANUAL	51
4.2) <i>OPEN FIELD</i>	57

4.2.1) ANÁLISE AUTOMÁTICA DE COMPORTAMENTO	57
4.2.2) ANÁLISE NEURONAL A PARTIR DE SEGMENTAÇÃO AUTOMÁTICA (SEGMENTOS DO CENTRO)	59
4.3) <i>EPM</i>	62
4.3.1) ANÁLISE AUTOMÁTICA DE COMPORTAMENTO NO EPM	62
4.3.2) ANÁLISE NEURONAL A PARTIR DE SEGMENTAÇÃO AUTOMÁTICA (SEGMENTOS DOS BRAÇOS FECHADOS)	64
4.3) <i>T-MAZE</i>	67
 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	 71
5.1) ALGORITMOS DE SEGMENTAÇÃO AUTOMÁTICA E COMPORTAMENTO	72
5.2) ANÁLISE NEURONAL (BREVE DISCUSSÃO)	76
5.3) FUTURAS MELHORIAS	80
 BIBLIOGRAFIA	 83
 ANEXOS	 I
ANEXO 1) ALGORITMOS IMPLEMENTADOS	II
ANEXO 2) PROTOCOLO DE GRAVAÇÕES	VII
ANEXO 3) PROTOCOLO DE STRESS	X

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Lista de Abreviaturas

ACd	Cingulado Anterior dorsal
ACv	Cingulado Anterior ventral
ADC	Conversor Analógico Digital
Aid	Orbital Ventral
CMS	<i>Chronic mild stress</i>
CPU	<i>Central Processing Unit</i>
CUS	<i>Chronic and Unpredictable Stress</i>
dHPC	Hipocampo dorsal
DFT	<i>Discrete Fourier Transform</i>
DTFT	<i>Discrete Time Fourier Transform</i>
EEG	Eletroencefalograma
EPM	<i>Elevated Plus Maze</i>
FFT	<i>Fast Fourier Transform</i>
Fr2	Frontal
GUI	<i>Graphical User Interface</i>
HB	<i>Hole Board</i>
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
HPC	Hipocampo
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
LFP	<i>Local Field Potentials</i>
IL	Infra-Límbica
LO	Lateral Orbital
MEG	Magneto-Encefalograma
MO	Medial Orbital
mPFC	Cortex Pré-Frontal medial
MTM	<i>Multi-Taper Method</i>
OF	<i>Open Field</i>
OFC	Lateral Ventral
PA	Potencial de ação
PL	Pré-Límbica
PFC	Cortex Pré-Frontal
RAM	<i>Random Access Memory</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TM	<i>T-Maze</i>
UPS	<i>Uninterruptable Power Supply</i>
VO	Ventral Orbital
vHPC	Hipocampo ventral

Lista de Símbolos

Símbolo	Descrição	Unidade
f	Frequência	[Hz]
Ω	Frequência angular	[rad.s ⁻¹]
ω	Frequência angular	[rad.s ⁻¹]

Lista de Figuras

Figura 1: Representação simplificada da estrutura de um neurónio	6
Figura 2: Representação esquemática de um potencial de acção.....	8
Figura 3: Representação esquemática da sincronização entre áreas cerebrais.....	12
Figura 4: Representação da arena tipicamente utilizada no OF	18
Figura 5: Representação da arena tipicamente utilizada no EPM.....	19
Figura 6: Representação da arena tipicamente utilizada no TM	21
Figura 7: Representação da arena tipicamente utilizada no HB	22
Figura 8: a) Representação da janela de Hanning b) Representação dos 3 primeiros <i>tapers</i> utilizados no método MTM.....	27
Figura 9: Representação do Diagrama de Blocos do sistema de aquisição	34
Figura 10: Representação do aparato utilizado no OF	38
Figura 11: Representação do aparato utilizado no EPM	41
Figura 12: Representação do aparato utilizado no TM.	44
Figura 13: Representação de um <i>screenshot</i> da GUI desenvolvida.....	48
Figura 14: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo do espectro de potência nos segmentos da actividade basal dos primeiros dias de gravação seleccionados manualmente	52
Figura 15: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo do espectro de potência nos segmentos da actividade basal dos últimos dias de gravação seleccionados manualmente	53
Figura 16: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo dos espectros de potência para todas as regiões cerebrais nos segmentos da actividade basal dos primeiros dias de gravação seleccionados manualmente nas bandas de frequência Teta (4 – 8 Hz), Alfa (9 – 13 Hz), Beta (13 – 30 Hz) e Gama (>30 Hz).....	53
Figura 17: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo dos espectros de potência para todas as regiões cerebrais nos segmentos da actividade basal dos últimos dias de gravação seleccionados manualmente nas bandas de frequência Teta (4 – 8 Hz), b e f) Alfa (9 – 13 Hz) Beta (13 – 30 Hz) e Gama (>30 Hz).	54

Figura 18: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo da coerência nos segmentos da actividade basal dos primeiros dias de gravação retirados manualmente.	54
Figura 19: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo da coerência nos segmentos da actividade basal dos últimos dias de gravação retirados manualmente	55
Figura 20: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo das coerências para todas as combinações de regiões cerebrais nos segmentos da actividade basal dos primeiros dias de gravação seleccionados manualmente nas bandas de frequência Teta (4 – 8 Hz), b e f) Alfa (9 – 13 Hz) Beta (13 – 30 Hz) e Gama (>30 Hz)	55
Figura 21: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo das coerências para todas as combinações de regiões cerebrais nos segmentos da actividade basal dos últimos dias de gravação seleccionados manualmente nas bandas de frequência Teta (4 – 8 Hz), Alfa (9 – 13 Hz), Beta (13 – 30 Hz) e Gama (>30 Hz)	56
Figura 22: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo da coerência (representada em código de cores) nos segmentos da actividade basal dos primeiros dias de gravação seleccionados manualmente.	56
Figura 23: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo da coerência (representada em código de cores) nos segmentos da actividade basal dos últimos dias de gravação seleccionados manualmente	57
Figura 24: Representação dos pontos do <i>tracking</i> em cada uma das regiões do OF de acordo com ao algoritmo de segmentação automática implementada.	58
Figura 25: Representação gráfica dos dados de comportamento obtidos de forma automática para o OF.	59
Figura 26: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo do espectro de potência nos segmentos do centro do OF	60
Figura 27: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo dos espectros de potência para todas as regiões cerebrais nos segmentos do centro do OF seleccionados automaticamente nas bandas de frequência Teta (4 – 8 Hz), Alfa (9 – 13 Hz), Beta (13 – 30 Hz) e Gama (>30 Hz)	60
Figura 28: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo da coerência nos segmentos do centro do OF	61
Figura 29: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo das coerências para todas as combinações de regiões cerebrais nos segmentos da actividade no centro do OF	61
Figura 30: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo da coerência (representada em código de cores) nos segmentos do centro do OF para cada animal	62

Figura 31: Representação dos pontos do <i>tracking</i> em cada uma das regiões do EPM de acordo com ao algoritmo de segmentação automática implementada	63
Figura 32: Representação gráfica dos dados de comportamento obtidos de forma automática para o EPM.	64
Figura 33: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo do espectro de potência nos segmentos dos braços fechados do EPM	65
Figura 34: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo dos espectros de potência nos segmentos dos braços fechados do EPM	65
Figura 35: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo da coerência nos segmentos dos braços fechados do EPM	66
Figura 36: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo das coerências para todas as combinações de regiões cerebrais nos segmentos dos braços fechados do EPM	66
Figura 37: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo da coerência (representada em código de cores) nos segmentos dos braços fechados do EPM para cada animal	67
Figura 38: Representação da coerência (banda de frequências teta) em janelas de 240 pontos (200 milissegundos) para um dos animais do grupo de CUS em todos os <i>trials</i>	69
Figura 39: Representação da coerência (banda de frequências gama) em janelas de 240 pontos (200 milissegundos) para um dos animais do grupo de CUS em todos os <i>trials</i>	69

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

Em estudos experimentais na área das neurociências é prática comum efectuarem-se testes de comportamento em animais (e.g. ratos e murganhos) para avaliação de um grande número de parâmetros. Os parâmetros tipicamente avaliados são: o stress, a ansiedade, a capacidade locomotora, a memória de trabalho (ou a memória espacial) e a aprendizagem. Estes testes também permitem avaliar o impacto de um determinado protocolo experimental (e.g. stress crónico e imprevisível, stress crónico moderado) nas capacidades de um grupo de animais em realizar os referidos testes. Alguns dos testes utilizados incluem: o *Open Field* (OF), o *Elevated Plus Maze* (EPM), o *T-Maze* (TM) e o *Hole Board* (HB), a descrição destes testes é feita na seção 2.2.4.

Trabalhos anteriores onde ratos adultos foram expostos a factores stressantes de forma crónica, revelaram que os animais sujeitos a este tipo de stress apresentavam um desempenho revelador de ansiedade e comprometimento de funções cognitivas como a memória, a flexibilidade de comportamento e a aprendizagem. Estas alterações comportamentais podem estar correlacionadas com alterações estruturais (alterações nas ramificações das dendrites dos neurónios piramidais do córtex pré-frontal, PFC) e electrofisiológicas no cérebro [12, 17, 23, 30, 36].

Para analisar os sinais neuronais (sinais electrofisiológicos gravados a partir do cérebro de animais) é necessário recorrer a programas específicos. Alguns destes programas são gratuitos enquanto que outros são comerciais. O programa *Neuroscope* (desenvolvido no laboratório Buzsáki, CMBN, Rutgers Newark, USA) é de distribuição gratuita e permite visualizar um tipo específico de sinais neurofisiológicos, os potenciais de campo local (do inglês *Local Field Potentials* – LFP) e os *spikes* (potenciais de acção) de acordo com a posição do animal no ambiente. Este programa

permite igualmente implementar funções de agrupamento (em inglês, *clustering*) de *spikes* gravados de vários neurónios em grupos de eléctrodos [40].

Outro programa para processamento de sinais electrofisiológicos é o *NeuroExplorer*, o qual se encontra apenas disponível comercialmente. Este programa possui diversas características, nomeadamente: permite importar dados de diferentes sistemas de aquisição, análise de LFPs e *spikes*, visualização de dados a três dimensões além de muitas hipóteses de *outputs* gráficos [63].

Existem outros tipos específicos de programas disponíveis para correr em ambiente *Matlab*®. Exemplos deste tipo de programas são o *Fieldtrip*, o *MeaTools* e o *EEGlab* [26, 58, 59].

O *Fieldtrip*® inclui funções básicas de análise no tempo e na frequência de LFP, EEG (electroencefalograma) e MEG (magneto encefalograma). O *MeaTools* inclui um conjunto de funções que permitem a análise de LFP e *spikes* em gravações efectuadas com *arrays* (matrizes) com múltiplos eléctrodos. Esta ferramenta oferece uma interface gráfica (GUI, do inglês *Graphical User Interface*) para uma melhor navegação através das suas funcionalidades. O *EEGlab* (SCCN – *Institute for Neural Computation*, Universidade da Califórnia) é também uma *toolbox* de livre distribuição que permite, graças a uma GUI, uma mais fácil navegação por entre as suas funções de processamento de sinais contínuos (EEG, MEG e outros sinais electrofisiológicos), análise no tempo e frequência e rejeição de artefactos. Além disso esta *toolbox* oferece também ferramentas para visualizar os sinais [26, 58, 59].

1.2 Motivação

Com este trabalho criou-se um programa para o processamento de sinais neuronais adquiridos de animais em movimento livre. O programa efectua o processamento de um tipo específico de sinais neuronais: os LFPs, os quais foram adquiridos a partir do cérebro de animais implantados cronicamente e em movimento livre. Pretende-se que o programa, além de permitir uma utilização simples também combinasse as principais funcionalidades de outros programas existentes (disponíveis quer comercialmente quer gratuitamente).

A necessidade desta ferramenta adveio do facto de nenhum dos programas disponíveis efectuarem, de um modo integrado uma análise de comportamento e de sinais electrofisiológicos. Esta ferramenta permite efectuar a segmentação de dados provenientes de testes de comportamento animal e aplicar os segmentos no cálculo de

espectros de potência e coerências em LFPs de acordo com os objectivos do teste.

A segmentação dos dados permite separar os períodos de interesse dos restantes. É a partir da segmentação que o *software* desenvolvido pode realizar automaticamente (através dos algoritmos implementados) ou manualmente (neste caso é o utilizador quem escolhe os segmentos) a análise de espectros de potência e coerências dos LFPs em períodos específicos da actividade do animal numa determinada tarefa comportamental. Esta análise é importante porque permite avaliar os dados neuronais em períodos específicos do teste e correlaciona-los os dados com a actividade do animal nesses mesmos períodos.

Os dados utilizados no desenvolvimento do programa apresentado nesta dissertação foram extraídos de uma experiência em que se procurava compreender de que forma a aplicação de um protocolo de stress crónico (stress crónico e imprevisível; *chronic and unpredictable stress - CUS*) sobre os animais afecta a actividade electrofisiológica de certas regiões cerebrais e quais as relações destas alterações com o seu comportamento e a sua performance em testes de comportamento. Assim, implantaram-se eléctrodos cerebrais nos animais o que permitiu o acesso à actividade cerebral electrofisiológica (LFPs) dos mesmos enquanto estes realizavam vários testes de comportamento ou se encontravam numa arena familiar (condição basal). Os LFPs foram adquiridos do hipocampo (HPC) e do córtex pré-frontal (PFC) dos animais acordados e em movimento livre. Foi possível correlacionar os resultados da análise neuronal com o desempenho dos animais nos diversos testes graças à integração da análise de dados electrofisiológicos e de dados comportamentais.

O programa desenvolvido permite segmentar de forma automática os sinais neuronais provenientes de cada teste segundo um determinado critério e sobre estes dados segmentados aplicar os algoritmos de extração de coerências e espectros. Para além disso a aplicação permite o tratamento estatístico dos dados (através do teste *t-student* para amostras independentes) e a criação de vários tipos de gráficos para apresentação dos resultados. Este critério pode ser a posição do animal numa determinada área de interesse do aparato de teste. Tomando como exemplo o caso do EPM, as áreas de interesse são a região central ou os braços abertos no caso do EPM. Também é possível extrair automaticamente, para o OF e EPM, um relatório referente ao comportamento do animal. Esta dissertação apresenta informações tipicamente utilizadas, nomeadamente o tempo despendido em cada região pré-determinada do teste

ou o número de entradas nessa região [27, 56]. A plataforma escolhida para o desenvolvimento desta aplicação foi o Matlab[®].

1.3 Organização da dissertação

Este Capítulo apresentou uma introdução geral bem como a motivação desta dissertação. No Capítulo 2 apresentam-se os fundamentos teóricos, tanto no campo nas neurociências como no campo do processamento de sinal necessário para a sua compreensão. O capítulo 3 descreve as principais especificações do programa desenvolvido, as principais funcionalidades e os algoritmos implementados. Os vários tipos de gráficos e resultados produzidos pela aplicação desenvolvida são descritos no capítulo 4. O Capítulo 5 faz a discussão dos resultados obtidos e propõe trabalho futuro.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

"I think before I am" René Descarte

2.1 Fundamentos de Neurociências

As Neurociências são uma das áreas científicas em mais amplo crescimento nos últimos anos. Esta área científica, através da combinação de conhecimentos multidisciplinares, procura entender o sistema nervoso e as bases biológicas para o comportamento. Nesta procura cooperam anatomistas (que estudam a forma do cérebro e a sua estrutura celular), químicos (que estudam a composição química do cérebro), fisiologistas (que estudam as propriedades eléctricas do cérebro), psicólogos (que estudam a organização das estruturas neuronais e a sua relação com o comportamento e cognição) e os engenheiros (que criam as ferramentas que possibilitam o estudo e a interface com o cérebro) [37, 61].

O termo neurociências foi introduzido em 1960 para denominar este campo científico onde as diversas áreas do saber cooperam na criação de uma linguagem comum e de forma a atingirem o mesmo objectivo: entender a estrutura do sistema nervoso e o seu papel na regulação do comportamento [61].

2.1.1 Os neurónios

O sistema nervoso é constituído por células nervosas, as quais incluem os neurónios (Figura 1) e um conjunto de células de suporte (estrutural e funcional): as células da glia. Os neurónios são as células responsáveis por receber, integrar e transmitir a informação no sistema nervoso central (SNC) [61].

Os neurónios encontram-se organizados em módulos funcionais que se repetem. Diz-se, portanto, que o cérebro é um sistema modular (o mais complexo do nosso corpo). Neste sistema, a arquitectura (anatomia, estrutura e bioquímica) reflecte uma

determinada função fisiológica. Deste modo a citologia, a biofísica e a bioquímica dos neurónios, estão organizadas de modo a cumprirem com a sua função fisiológica principal: a modulação do comportamento humano [61].

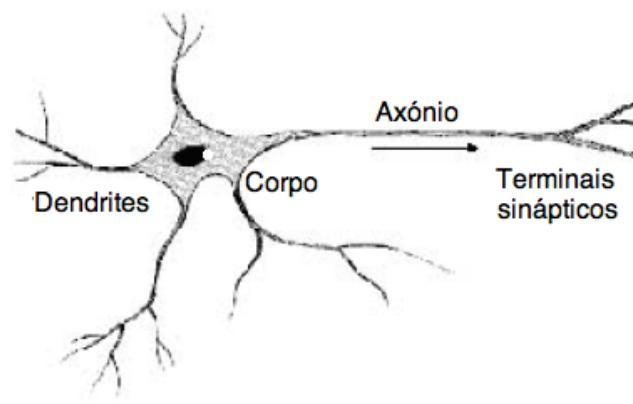


Figura 1: Representação simplificada da estrutura do neurónio (adaptado de [29]).

Os neurónios são responsáveis por gerar e transmitir impulsos eléctricos (PA, potenciais de acção) ao longo de longas distâncias. Os neurónios são células altamente especializadas mas que possuem uma grande diversidade de funções assim como a capacidade de se ligarem com outros neurónios em redes ou circuitos. É desta capacidade que dependem funções cerebrais tão importantes como a sensação, a percepção, a memória e a cognição. Os neurónios são classificados de acordo com a sua função: aferente, se transmitem informação sensorial da periferia para o sistema nervoso central, eferente, se transmitem informação do sistema nervoso central para os outros tecidos ou interneurónios se transmitem informação entre diferentes áreas do sistema nervoso. Os neurónios também são classificados segundo o neurotransmissor (molécula envolvida na transmissão de informação no sistema nervoso) que utilizam ou sintetizam (glutamatérgico, colinérgico, etc.) e também pelo seu formato (piramidal, grânulo e mitral, etc.) [61].

A estrutura típica de um neurónio inclui o corpo celular (*soma*), as dendrites e o axónio. As dendrites são estruturas que se estendem a partir do corpo celular subdividindo-se e formando uma estrutura em árvore (árvore dendrítica). O axónio é uma extensão que também tem origem no corpo celular do neurónio mas que se pode estender a grandes distâncias. A maioria dos neurónios apresenta um axónio para comunicar com outros neurónios alvo e muitas dendrites que se estendem a partir do corpo celular para receber informação de outros neurónios. Assim, na maioria das comunicações entre neurónios os sinais são enviados através do axónio de um neurónio

para a dendrite de outro neurónio (no entanto existem excepções) [61].

A palavra sinapse vem do grego, associação, e descreve a conexão entre dois neurónios ou entre um neurónio e um músculo. A sinapse é composta por três elementos: a membrana pré-sináptica (que é formada no botão terminal do axónio), a membrana pós-sináptica (que é formada pela membrana da dendrite ou corpo celular) e pelo espaço entre estas duas estruturas (o qual se designa por fenda sináptica) [37].

As sinapses podem ser eléctricas ou químicas. As sinapses eléctricas acontecem quando existe uma ligação mecânica e eléctrica entre dois neurónios próximos. Esta ligação é formada quando a distancia entre o neurónio pré-sináptico e pós-sináptico é de cerca de 3.5 nm. Este tipo de sinapses é bidireccional (na maioria dos casos) e mais rápida do que o tipo químico e por isso é frequentemente encontrada em actos reflexos. Assim, as sinapses eléctricas são mais simples do que as sinapses químicas. Nas sinapses químicas os dois neurónios comunicantes podem estar afastados um do outro pelo menos 20-40 nm. Neste tipo de sinapse a comunicação pode dar-se entre neurónios mas também entre neurónios e músculos. São as sinapses químicas que permitem que os neurónios se organizem em redes dentro do sistema nervoso, sendo isto a chave para a percepção, a cognição, a memória e o controlo do sistema nervoso sob as outras partes do corpo. Assim, existe um tipo específico de moléculas (os neurotransmissores) que são libertadas na fenda sináptica (fenda entre o neurónio pré-sináptico e o neurónio pós-sináptico) pela despolarização da membrana devido ao potencial de acção (seção 2.1.2). Estes neurotransmissores ligam-se a receptores no neurónio pós-sináptico causando também a sua despolarização e levando a que o PA seja transmitido de um neurónio para o outro. Os neurotransmissores são moléculas endógenas envolvidas na transmissão de informação entre neurónios e as células alvo [25]. Os neurotransmissores podem ser de vários tipos (dependendo da sua composição química): podem ser excitatórios ou inibitórios (e ambos podem estar envolvidos em vários tipos de funções). Alguns dos neurotransmissores mais importantes são: o glutamato (excitatório e está ligado ao armazenamento de informação no cérebro), o GABA (inibitório e é a partir deste que muitos sedativos actuam) a dopamina (que tem um papel importante na busca de recompensa), entre outros [37].

2.1.2 Os potenciais de acção

Os neurónios são células muito especiais pois têm a capacidade de comunicar com outros neurónios de uma forma rápida e através de longas distâncias. Os neurónios comunicam através de impulsos eléctricos que viajam ao longo dos seus axónios. Estes impulsos eléctricos designam-se por potenciais de acção (Figura 2) ou *spikes* [20].

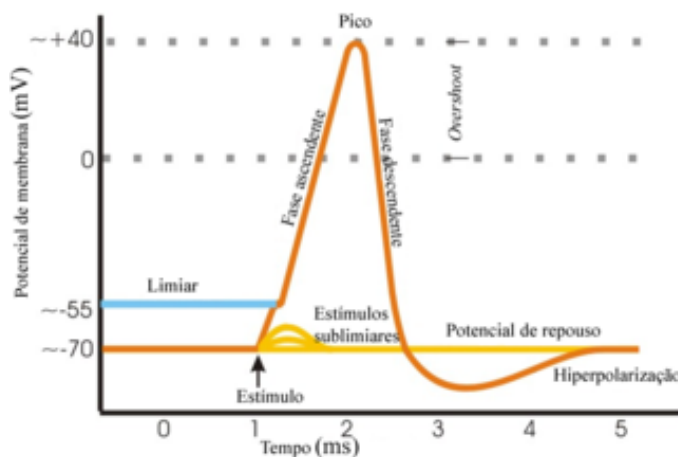


Figura 2: Representação esquemática de um potencial de acção adaptado de [6].

Os potenciais de acção são gerados devido à despolarização da membrana da célula e acontecem porque os neurónios são células eléctrica e quimicamente excitáveis (capazes de responder activamente a estímulos eléctricos e químicos). O potencial de acção é a “linguagem” usada pelo sistema nervoso para transmitir informação. Eles são gerados e viajam ao longo do axónio até encontrar outro neurónio (dendrite de outro neurónio) e comunicar através da sinapse [61].

As células apresentam uma diferença de potencial que resulta da diferença de concentração iónica entre o interior e o exterior da célula (o interior da célula está carregado negativamente relativamente ao meio extracelular). A permeabilidade da célula a certos iões varia conforme é alterado o potencial da membrana da célula. Assim o potencial de acção não é mais do que o resultado de uma série de alterações no potencial da membrana de forma a alterar a sua permeabilidade a certos iões. Estas alterações induzem o fluxo destes iões segundo o seu gradiente bioquímico (do local onde a sua concentração é maior para o local onde é menor) fazendo com que o potencial da membrana se altere e a membrana despolarize. O potencial de repouso da membrana é dado pelo gradiente de concentração dos iões e pela permeabilidade da

célula aos diferentes iões (K^+ e Cl^- são os iões aos quais a membrana apresenta uma permeabilidade maior). Na ausência de estímulo, as correntes de iões para dentro e para fora da célula têm como objectivo a manutenção do potencial de equilíbrio da célula. Como resultado, o potencial de repouso é de -70 até -80 mV (valor próximo daquele em que os iões K^+ e Cl^- têm concentrações e gradientes eléctricos iguais e opostos dentro e fora da célula, ou seja é o potencial de equilíbrio de cada ião) [20].

O potencial de acção acontece quando o estímulo dado à célula ultrapassa um determinado limiar (*threshold*). O estímulo pode ser produzido por qualquer receptor sensitivo, outros potenciais de acção a acontecer perto da célula ou uma corrente eléctrica aplicada experimentalmente. Quando os iões positivos entram na célula isso tende a tornar o seu interior menos negativo (mais próximo de zero) resultando num maior fluxo de iões K^+ para fora da célula (para tentar repolarizar). Nesta altura os canais de Na^+ (dependentes da tensão) ficam abertos permitindo o fluxo de iões Na^+ para dentro da célula, aumentando a sua despolarização. Quando o estímulo cessa a membrana repolariza sozinha pois o efeito da saída de K^+ é mais forte do que a entrada de Na^+ . Mas, quando o estímulo é maior, o efeito da entrada de Na^+ excede aquele causado pela saída de K^+ , levando a mais despolarização. O valor mais baixo de despolarização que conduz a este efeito designa-se por limiar de despolarização [20].

A curva ascendente do potencial de acção (Figura 2) é causada pelo fluxo de iões Na^+ para o interior da célula (como resultado da abertura dos canais de sódio dependentes de tensão). Nesta fase do PA, a despolarização leva a mais despolarização (retroalimentação positiva), ou seja, leva à abertura de mais canais de sódio. Na mesma imagem (Figura 2) pode-se observar que o potencial de membrana começa a decrescer. Esta curva descendente é causada pelo fecho dos canais de sódio e pela abertura dos canais de potássio (que causa a saída do ião K^+ e consequente repolarização). Depois de ocorrer um PA é impossível a célula produzir outro imediatamente a seguir (período refractário absoluto) e passado um determinado tempo (período refractário relativo) [20].

2.1.3 Os *Local Field Potentials* (LFP's)

Os *Local Field Potentials* (LFPs) são uma classe de sinais electrofisiológicos produzidos pelas correntes iónicas que fluem devido à actividade pós-sináptica das dendrites de um conjunto de neurónios. O registo de LFPs é feito internamente e

representa a actividade de milhares de neurónios [33]. Ou seja, os LFPs são a medida da tensão (potencial) que é produzida pela soma da actividade pós-sináptica dos neurónios num determinado volume de tecido [54]. Outros trabalhos científicos demonstraram que as flutuações nos LFPs estão altamente correlacionadas com as flutuações de voltagem medidas simultaneamente no interior dos neurónios [45, 54].

Os LFPs são sinais de baixa amplitude (tipicamente na ordem dos μV) e ocupam uma banda de frequência abaixo dos 250 Hz. No sinal adquirido sem filtragem, as frequências baixas (tipicamente <250 Hz) devem-se ao fluxo de corrente que acontece devido a actividade pós-sináptica dos neurónios (localizados entre 350 μm -3 mm de distancia). Por outro lado, as frequências superiores acontecem devido aos potenciais de acção (que são variações mais rápidas) de conjuntos localizados a distancias entre 50-350 μm . Deste modo é necessário filtrar o sinal com recurso a um filtro passa-baixo (com uma frequência superior de corte de 250 Hz) para obter a banda correspondente aos LFPs [54]. Apesar destas distancias serem frequentemente citadas em publicações científicas, existe um artigo que refere que mais do que 95% do sinal gravado no LFPs é originado por neurónios presentes a uma distância de 250 μm dos el são sinais de baixa amplitude (tipicamente na ordem dos μV) e ocupam uma banda de frequência abaixo dos 250 Hz [].

Os LFPs são adquiridos com recurso a microelctrodos (com impedâncias na gama do 0,1-1 $\text{M}\Omega$) para permitir registar a actividade de um grande número de neurónios. Os elctrodos tipicamente utilizados na gravação permitem adquirir sinais com grande largura de banda, isto implica que o sinal seja posteriormente filtrado com recurso a um filtro passa baixo (com frequência superior de corte de cerca de 250 Hz). Isto justifica-se porque, conforme foi acima referido, a actividade a registar nos LFPs localiza-se abaixo desta frequência [31, 43].

Os LFPs são registados como a diferença entre um elctrodo activo colocado num local de interesse do cérebro e um elctrodo de referência (localizado noutra região do cérebro). A abertura de canais iónicos origina diferenças de concentrações iónicas no meio extracelular, criando uma corrente local. Estas correntes locais alteram o potencial eléctrico do tecido extracelular e criam uma diferença de potencial entre o elctrodo de gravação e o elctrodo de referência. A soma destas correntes locais produzidas pela actividade pós-sináptica das dendrites dos neurónios que é medida pelos elctrodos de gravação e registada nos LFPs [31, 43].

Apesar de historicamente os *spikes* serem mais estudados do que os LFP's o interesse da comunidade científica acerca deles está aumentar. Estudos feitos demonstraram que a actividade neuronal adquirida nos LFPs é uma medida bastante precisa dos processos neuronais que guiam uma variedade de funções cerebrais tais como a percepção, a atenção, a memória e a acção [54].

2.1.4 O cérebro e o comportamento

O cérebro humano é um sistema complexo de processamento de sinais constituído por cerca de 1011 centenas de biliões de neurónios que fazem em média 10^{15} - 10^{16} quadriliões de sinapses [61].¹

O cérebro é muitas vezes comparado com o CPU de um computador. A existência de tantos neurónios e sinapses garante uma grande capacidade de memória e de processamento. De facto, o cérebro é um computador, mas de um tipo muito especial pois é biológico e foi evoluindo durante milhões de anos. O cérebro é o órgão responsável por manter o corpo vivo e com saúde e que ao mesmo tempo permite pensar e sentir, ou seja, é o órgão da consciência [61].

No cérebro, como em qualquer outra máquina, a estrutura e a função estão intimamente ligadas. De facto, é a estrutura do cérebro que dá suporte físico às suas funções fisiológicas. O objectivo final das neurociências é conseguir entender a estrutura e a sua relação com a função no cérebro humano. Grandes progressos têm vindo a ser feitos em estudos em animais (como os ratos). O que se descobriu até agora foi que todos os vertebrados partilham a mesma organização fundamental do sistema nervoso, ou seja, em todos os vertebrados estão associadas às mesmas partes do cérebro [37, 61].

A comunicação entre diferentes áreas do cérebro é a chave para a cognição. Os neurónios não actuam isoladamente; eles estão ligados entre si em redes e são estas redes que permitem ao cérebro a troca de informações entre as diversas áreas. As redes de neurónios são ritmicamente activadas e inibidas, dependendo do estado do cérebro, ao mesmo tempo que contribuem para a representação integrada de experiências, a retenção de informação, flexibilidade de comportamento, a aprendizagem e a percepção [5, 8, 34].

Existe uma predisposição das diferentes redes de neurónios do cérebro para

¹ Bilião é o termo utilizado para representar 10^{12} .
Quadrilião é o termo utilizado para representar 10^{24} .

oscilar numa determinada banda de frequências. Estas oscilações são a chave para a comunicação entre as diversas áreas do cérebro. A sincronização/dessincronização entre as diferentes áreas que permite o fluxo/bloqueio de informação de uma área para outra. Como tal, os ritmos do cérebro são fundamentais para a modulação, filtragem e redireccionamento de informação dentro do sistema nervoso [8].

Apesar de ainda existir muito por descobrir sobre o papel da sincronização na comunicação entre diferentes áreas do cérebro, sabe-se que estes ritmos cerebrais (através dos quais a comunicação entre várias áreas cerebrais é modulada) estão presentes nos sinais adquiridos quer nas gravações à superfície do cérebro (EEG) quer nas gravações mais invasivas (LFPs). A frequência a que ocorrem estas oscilações depende de muitos factores e propriedades das redes neuronais; nomeadamente podem ser oscilações lentas (com períodos de vários segundos) ou oscilações rápidas. Além disso, podem existir oscilações em diferentes bandas de frequência, ao mesmo tempo e nas mesmas regiões do cérebro [28].

Em redes de neurónios sincronizadas, a fase das ondas determina o grau de excitabilidade dos neurónios. A sincronização de fase (Figura 3) entre as oscilações de duas áreas cerebrais acontece quando as fases de oscilação das duas áreas estão correlacionadas. É a sincronização de fase que está então na base de funções cerebrais importantes como é o caso da memória [28].

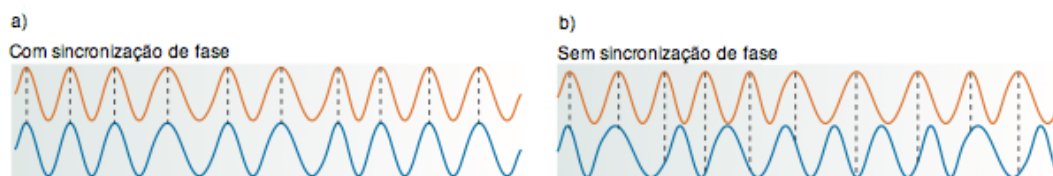


Figura 3: Representação esquemática da sincronização entre áreas cerebrais a) Ondas em sincronização de fase b) Ondas em não-sincronização de fase (adaptado de [28]).

Uma das formas de analisar a sincronização entre duas áreas do cérebro é através do cálculo da coerência. A coerência é uma grandeza física que avalia o grau de correlação entre duas ondas. Além disso, a coerência entre duas ondas depende da sua fase relativa. O resultado da coerência é um número entre 0 e 1 que numa perspectiva biológica quantifica a sincronização (dependente da frequência e da fase relativa das ondas) entre dois sinais cerebrais. Ou seja, se duas áreas apresentam uma coerência elevada, isto quer dizer que pode existir uma ligação funcional entre elas. A coerência como grandeza física e o seu cálculo matemático estão descritos em pormenor na seção 2.3.2.

O córtex pré-frontal

O córtex pré-frontal (PFC) é uma região do cérebro muito importante na regulação do comportamento e também na regulação de funções autonómicas e neuro-endócrinas do cérebro. Sendo considerado como a memória RAM (armazenamento e manipulação de informação de forma temporária), o PFC inclui todas as áreas do lobo frontal do cérebro [13]. O trabalho de Damásio e colaboradores revelou que o PFC está envolvido na memória de trabalho, na tomada de decisão, no planeamento e na flexibilidade de comportamento (assim como nas interacções sociais) e no processamento de emoções [4,18]. Outros trabalhos realizados com primatas demonstraram o envolvimento das áreas lateral, medial e ventral do PFC na previsão de recompensas e na tomada de decisão baseada em experiências passadas [42]. Noutro trabalho demonstrou-se o papel importante do PFC na aprendizagem [16].

Durante alguns anos pensou-se que esta área do cérebro, como era maior nos primatas, era exclusiva dos mesmos, actualmente considera-se que a região no polo frontal do cérebro do rato é o equivalente ao PFC dos primatas. As áreas pertencentes ao PFC dos ratos podem ser agrupadas em duas regiões principais: a região medial (mPFC) e a região lateral e ventral (OFC). O mPFC tem as mesmas características das regiões dorsolateral e medial do PFC humano e inclui: a área frontal (Fr2), cíngulo anterior dorsal e ventral (ACd e ACv), pré-límbica (PL), medial orbital (MO) e infra-límbica (IL). O OFC apresenta semelhanças com o córtex orbito-frontal dos humanos e comporta: a área dorsal agranular insular (Aid), a área orbital ventral (LO), lateral orbital (VO) e ventral orbital (VO) [13].

Do estudo anatómico e funcional destas duas grandes áreas acima descritas conclui-se que o PFC dos ratos se subdivide numa área ventrolateral (que tem um papel muito importante na regulação de comportamentos sociais), numa área dorsomedial (cujo papel fundamental é regular a memória de trabalho) e numa área ventromedial (que está ligada à regulação da actividade das vísceras). Estas duas últimas áreas constituem o mPFC dos ratos. O mPFC recebe projecções de estruturas límbicas (incluindo a amígdala, o hipocampo ventral) e providencia envia projecções directas para o hipotálamo e áreas do tronco cerebral, as quais se relacionam com a regulação das emoções e com a resposta fisiológica ao stress [13].

2.2 O Stress e o cérebro

Todos os organismos vivos apresentam uma procura constante pelo equilíbrio. O stress pode então ser visto como uma série de eventos psicológicos e físicos que ameaçam esta busca pelo equilíbrio. Estes eventos chamam-se *stressores*. O cérebro (através do hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala) tende a contrariar os efeitos negativos causados pelo stress libertando adrenalina e noradrenalina de forma a aumentar a concentração de glucocorticóides no sangue com vista a activar as redes neuronais responsáveis pela adaptação do comportamento à situação. Esta resposta ao stress é rapidamente activada quando necessária e desactivada quando já não é necessária. O problema acontece quando esta resposta ao stress é inadequada, excessiva ou demasiado longa. Este tipo de respostas aumentam o risco de doenças mentais em indivíduos geneticamente predispostos a tal [38].

O stress crónico acontece quando os indivíduos são diariamente expostos a eventos psicologicamente fracturantes e extremos. Os efeitos negativos do stress crónico na saúde geral estão bem documentados [7]. De facto, as pessoas expostas a stress crónico apresentam uma maior probabilidade de desenvolverem úlceras gástricas, infecções respiratórias e doenças do foro psicológico [17]. Estudos feitos em humanos demonstraram que os indivíduos expostos a stress apresentam frequentemente sintomas depressivos e uma maior probabilidade de desenvolver esquizofrenia [17]. Outro estudo realizado em animais demonstrou o aparecimento de efeitos do stress crónico ao nível da cognição. O stress crónico parece estar relacionado com o défice cognitivo demonstrado em testes onde estão implicadas a memória espacial, a memória de trabalho e flexibilidade de comportamento [12, 48].

Estudos feitos em ratos [17, 36] revelaram que o stress tem implicações na estrutura física dos neurónios e por consequência nas redes por eles formadas (que como já foi demonstrado estão na base da cognição, da aprendizagem e da memória) [12]. Estas alterações histofisiológicas que se dão devido ao stress crónico têm implicações ao nível do comportamento. O stress crónico leva ao aparecimento de sintomas depressivos, estados de muita ansiedade bem como défices de memória e aprendizagem. Estas alterações foram observadas tanto em roedores como em humanos [48].

2.2.1 Impacto do stress crónico na ligação HPC-PFC

Trabalhos anteriores demonstraram que a estimulação do PFC induz um aumento na concentração plasmática de corticoesteróides. No entanto, o papel do PFC na regulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é complexo. Foi demonstrado que a actividade regulatória do mPFC no eixo HPA é comprometido em animais sujeitos a stress crónico [13].

Estudos sobre o impacto do stress crónico na estrutura e função do cérebro demonstraram que a memória espacial e de trabalho são comprometidas. A memória de trabalho (definida como a capacidade de armazenar e processar informação temporariamente) é muito importante para guiar o comportamento. Para além da memória, também a flexibilidade de comportamento (outra capacidade associada com a actividade normal do PFC) fica comprometida quando os animais são sujeitos a stress crónico. É também sabido, de estudo prévios que o stress crónico provoca um rearranjo das dendrites apicais dos neurónios piramidais das camadas II–III do PFC, resultando numa atrofia dos ramos das dendrites distais e numa perda de espinhas. Esta atrofia dos ramos das dendrites é a principal responsável pela perda significativa de volume nas camadas superiores do PFC e é consequência da acção dos corticoesteróides libertados no sangue como resposta ao stress [12]. Outros estudos demonstraram que animais sujeitos a stress crónico apresentam num padrão de reorganização dendritica igual ao que aparece quando estes são sujeitos a injeções de corticoesteróides [17].

Esta vulnerabilidade especifica das dendrites apicais aos efeitos dos corticoesteroides reflecte a distribuição topográfica dos *inputs* das camadas II–III dos neurónios piramidais do PFC. Enquanto as dendrites basais e da soma recebem projecções do tálamo, as dendrites apicais (presentes nas camadas superficiais) recebem projecções de estruturas límbicas (incluindo o hipocampo), córtex entorrinal e o núcleo basal da amígdala. Ou seja o stress marca especificamente as camadas que recebem comunicações de zonas límbicas como o hipocampo e que indica que os efeitos do stress crónico podem afectar esta conexão [13].

Sendo assim, o stress (induzido pelos corticoesteróides) afecta o hipocampo e o PFC que, como foi previamente referido, actuam na resposta natural ao stress. Paradoxalmente o stress crónico tem como alvo as estruturas que, numa situação normal, são responsáveis por restabelecer o equilíbrio. Sendo a conexão entre o

hipocampo e o PFC afectada pelo stress crónico então é de esperar que nestes casos exista um comprometimento da memória espacial e de trabalho (que são funções atribuídas a esta conexão) [12].

O hipocampo está ligado ao PFC através dos axónios que têm origem nas regiões do subículo e CA1 ventral do hipocampo e terminam nas células piramidais e interneurónios do PFC. Foi demonstrado que o stress crónico afecta o desenvolvimento de potenciação de longo-termo (*long-term potentiation* - LTP, que é a assinatura electrofisiológica do reforço sináptico) [12]. A plasticidade sináptica (que é a habilidade de modificar a força da sinapse) é a chave para a aprendizagem e adaptação de comportamento. A plasticidade das sinapses entre o hipocampo e o PFC está envolvida na memória de curto prazo. Estas descobertas ajudam a entender de que forma como o stress crónico influencia a memória de trabalho e consequentemente tarefas que exijam esta capacidade. A via PFC-hipocampo é danificada pelo stress, impedindo o PFC de responder de modo normal. Esta limitação da via PFC-HPC faz com que a amígdala assuma o domínio na regulação do comportamento. Desta forma, é de esperar que os animais stressados quando sujeitos a testes de comportamento apresentem resultados reveladores de estados ansiosos e dificuldades de aprendizagem e de memória.

2.2.2 Modulação do comportamento em ambientes stressantes

Estudos recentes demonstraram que o hipocampo ventral (vHPC) é importante para um comportamento normal dos ratos em ambientes ansiogénicos, como é o caso do *Open Field* (OF) ou do *Elevated Plus Maze* (EPM) (ver secção 2.2.4) [5]. Outra região do cérebro também relacionada com a ansiedade é o córtex pré-frontal (PFC), mais especificamente o mPFC (córtex pré-frontal medial) que recebe projecções directas do vHPC (hipocampo ventral) e indirectas do dHPC (hipocampo dorsal). Foi demonstrada a importância do mPFC nos comportamentos ansiosos e das suas conexões com outras áreas do cérebro como a amígdala e outras estruturas límbicas [19, 47]. O PFC é então uma região importante na regulação do comportamento em ambientes em que o HPC também actua. Sendo assim, pensa-se que o vHPC e o mPFC cooperam para mediar comportamentos de ansiedade. Outros estudos mediram uma coerência elevada entre estas estruturas cerebrais na gama de frequências teta (4-12 Hz) entre o mPFC e o vHPC quando o animal realizava comportamentos que exigiam memória de trabalho [46]. Coerências altas na gama teta foram também encontradas entre o hipocampo e o

estriado durante a aprendizagem e com a amígdala durante o medo [22, 60].

O vHPC é uma estrutura cerebral ligada à representação espacial, sendo o papel do mPFC a integração desta informação. Assim, o mPFC recebe projeções do vHPC e transmite essa informação para a amígdala que actua de modo a produzir um comportamento defensivo adequado quando o animal se encontra num ambiente estranho e stressante [1].

Um estudo realizado em que os LFPs eram gravados do hipocampo e do PFC dos animais revelou a existência uma sincronia entre o vHPC e o mPFC na banda teta que é modulada pela ansiedade [1]. Assim, em ambientes como o OF e o EPM a sincronia entre estas duas áreas é maior (ou seja em ambientes susceptíveis de causar ansiedade). A potencia do sinal adquirido nesta banda de frequências aumentou nestes dois testes. A principal conclusão é que a sincronização entre estas duas estruturas cerebrais é um dos mecanismos pelo qual os comportamentos em ambientes que provocam ansiedade nos animais pode ser modulado [1].

2.2.3 Protocolo de stress

Existem vários tipos de protocolos de stress bem como diferentes tipos de stressores que podem ser aplicados em animais para mimetizar os elementos encontrados na vida quotidiana [23]. Estes protocolos são por exemplo, o *chronic and unpredictable stress* (CUS) ou o *chronic mild stress* (CMS). O protocolo aplicado no âmbito desta dissertação foi o CUS. Neste protocolo fazem parte vários stressores que são aplicados durante 21 dias (o número de dias difere conforme a experiencia efectuada tipicamente entre 21 a 28 dias) aleatória e imprevisivelmente. Este protocolo evita que os animais desenvolvam mecanismos de habituação ao stress (resiliência) uma vez que este é aplicado de uma forma imprevisível. Sendo assim, durante os dias de implementação do protocolo, aplica-se um stressor diferente em cada dia e a uma hora diferente. Durante este período observa-se um decréscimo no peso dos animais e uma elevação nos corticoesteróides plasmáticos quando comparados com os animais que durante os mesmos períodos apenas são sujeitos a manuseamento (*handling*).

Os stressores aplicados podem ser: *shaking* (que consiste em provocar uma vibração no animal), o *restraint* (que consiste em confinar o animal a um local muito pequeno de onde este não possa sair), *cold air* (que consiste em aplicar no animal um jato de ar frio), *noise* (que consiste em colocar o animal num ambiente ruidoso, entre outros). O protocolo de stress aplicado pode ser consultado no Anexo A3.

2.2.4 Os testes de comportamento

O Open Field (OF)

O *Open Field* (OF) é um dos testes mais utilizados em estudos de avaliação emocional em animais, principalmente os comportamentos ligados com a ansiedade [9].

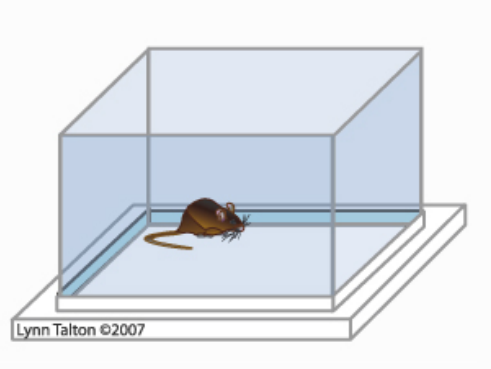


Figura 4: Representação da arena tipicamente utilizada no OF (adaptado de [62]).

O OF, enquanto teste de avaliação da ansiedade, mede a reacção dos animais perante um elemento stressante que neste caso é a arena aberta e iluminada do OF. A arena aberta e iluminada do OF é um elemento stressante porque os ratos apresentam um medo natural de espaços abertos e iluminados (agorafobia). Embora seja amplamente utilizado em roedores, existem variações deste teste que permitem a sua utilização numa grande variedade de espécies (coelhos, porcos, primatas, etc.)

Em termos gerais, o teste consiste na colocação do animal no centro de uma arena iluminada, desconhecida e da qual este está impedido de escapar devido à existência de paredes de protecção [56].

Tipicamente, a arena do OF (Figura 4) divide-se em duas regiões, nomeadamente o centro e a periferia. Existe um largo número de formatos de OF (circular, quadrado ou rectangular) e tipos de iluminação possíveis (lâmpada em cima ou por baixo quando o chão é transparente). Para além da arena tipicamente utilizada (quadrada) existem outros cenários em que são colocados outros aparatos na região central da arena, como plataformas, colunas e túneis.

Regra geral, os roedores apresentam uma tendência natural para evitar a zona central do teste e a deslocarem-se junto às paredes laterais. Os factores que no OF se podem correlacionar negativamente com ansiedade são o aumento do tempo despendido na zona central do teste, o aumento do rácio entre locomoção no centro e a locomoção

total e o aumento do número de entradas na zona central do teste. Para aceder à locomoção na arena no OF divide-se o teste em pequenas secções e contam-se o número de cruzamentos entre diferentes secções. Se o OF utilizado for de formato quadrangular, as secções serão quadrados [56].

O teste inicia-se com a colocação do animal na zona central da arena. O animal pode explorar livremente a totalidade da arena de teste durante 5 minutos. O tempo de duração do teste depende dos seus objectivos. A duração do teste tipicamente ronda os 5 minutos se o parâmetro a avaliar for a ansiedade. Contudo, se o parâmetro a avaliar for a capacidade locomotora o tempo de duração do teste é de 10 minutos ou mais. Os parâmetros acima descritos são avaliados durante este tempo [56].

Os estudos efectuados até a data revelaram que o comportamento no OF pode variar quando os animais são sujeitos a factores stressantes e como tal apresentam um nível de ansiedade basal mais elevado. Por exemplo, animais em privação de comida apresentam menos entradas na região central do teste.

O *Elevated Plus Maze* (EPM)

O *Elevated Plus Maze* (EPM) é um teste de comportamento utilizado para avaliar ansiedade em roedores. Apesar de existirem outros testes de comportamento, o EPM é um dos mais utilizados. O aparato utilizado no EPM é uma plataforma elevada com o formato de uma cruz. Nesta cruz, dois dos braços são abertos (sem barreiras) e os restantes dois são fechados. O aparato típico do EPM encontra-se representado na Figura 5 (no entanto a figura não mostra que a plataforma está elevada) [27, 35].

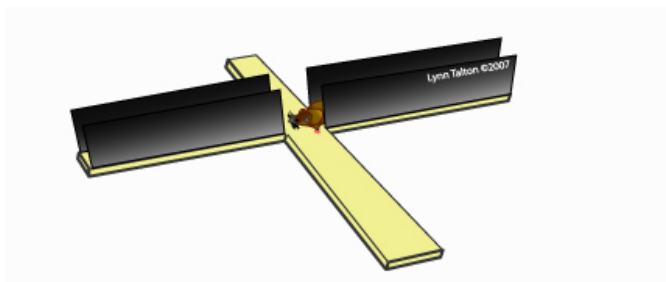


Figura 5: Representação do aparato tipicamente utilizado no EPM adaptada de [62].

O aparato utilizado para o EPM é tipicamente de cor preta. Os ratos apresentam uma tendência natural para evitar elevações e regiões muito iluminadas e a preferir as

regiões escuras e estreitas. Estes dois factores explicam a razão de os roedores geralmente evitarem a permanência nos braços abertos do EPM. Neste teste o medo natural que os roedores têm de sítios elevados entra em conflito com a sua curiosidade natural em explorar novos locais. Assim, os ratos! preferem permanecer nos braços fechados mas a sua curiosidade natural vai impor-se levando-os a explorar o restante território. Um rato nervoso ou ansioso não vai conseguir tomar a decisão de explorar o novo território e vai recorrer à suas acções habituais e permanecer mais tempo nos braços fechados onde se sente seguro [24].

Este modelo de comportamento também apresenta algumas desvantagens. No EPM existem muitas variáveis que devem ser cuidadosamente controladas pelo utilizador. A construção do aparato de teste influencia a actividade exploratória do animal (inclusão de pequenas bordas nos braços abertos, escolha do material das paredes, opacas ou transparentes, entre outros) [66].

Os parâmetros críticos e determinantes tipicamente medidos no EPM e que podem ser correlacionáveis com a ansiedade são o tempo despendido nos braços abertos e o número de entradas efectuadas nestes braços por oposição ao tempo despendido nos braços fechados e entradas nos mesmos. As entradas nos braços abertos são tipicamente analisadas como uma percentagem do número total de entradas efectuadas em ambos os braços [27].

No EPM, os animais são colocados no centro da cruz, sendo-lhes permitido explorar livremente todo o aparato durante alguns minutos. É sabido (de outros trabalhos anteriores) que os roedores têm tendência a afastar-se de lugares abertos e elevados do chão, logo os braços abertos do EPM causam uma resposta negativa nos ratos [27].

O T-Maze

Existem diversos tipos de testes de comportamento realizados com animais que incluem aparatos em forma de labirintos [21]. Estes testes são utilizados para aceder a princípios de aprendizagem e memória em roedores. Assim, através da realização deste tipo de testes pode-se determinar a forma como que determinados tratamentos ou condições afectam a habilidade dos animais no campo da aprendizagem e da memória. O *T-Maze* é uma variante popular deste tipo de testes, mas existem outros tais como o *Radial arms maze* ou o *Morris water maze* [21].

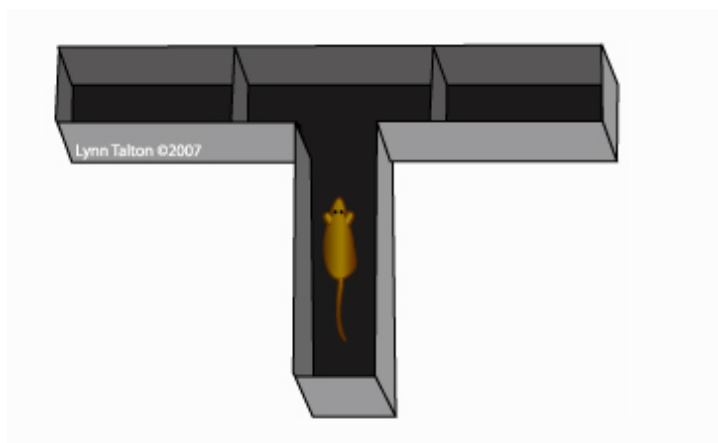


Figura 6: Representação do aparato utilizado no *T-Maze* adaptado de [62].

O *T-Maze* tal como o seu nome indica é um teste do tipo labirinto em forma de T. Conforme indicado na Figura 6, este teste inicia-se com o animal colocado na base do T. A recompensa pode estar em qualquer um dos braços. O rato inicia a marcha após a abertura de uma porta na zona da sua posição inicial e quando chega à intersecção entre os dois braços tem de escolher um deles [21].

A escolha é avaliada dependendo do critério do investigador. Pode-se estar a avaliar a capacidade de encontrar a recompensa, a actividade espontânea ou a preferência por um determinado braço do T. Baseando-se num destes critérios, o *T-maze* pode então ser utilizado para testar a memória, a aprendizagem, a preferência por estímulo ou recompensa, ou as alterações espontâneas de comportamento.

Se forem efectuados dois ensaios consecutivos com o mesmo animal no *T-maze*, este tende a preferir o braço que da primeira vez não foi visitado. A este comportamento chama-se “alteração espontânea” e é favorecida quando o animal se encontra em privação de comida e, claro, dando ao animal uma recompensa em forma de comida. A actividade do animal no *T-Maze* é altamente sensível a disfunções no hipocampo todavia, outras estruturas cerebrais também podem estar envolvidas [21].

O número de ensaios e o critério estudado no teste dependem dos dados que se pretendem extrair. Os pormenores sobre os critérios utilizados e o modo como o teste foi conduzido no âmbito desta experiência são descritos no capítulo 3.

O Hole Board (HB)

Outro teste de comportamento para roedores é o *Hole Board* (HB) representado na Figura 7. Concebido por *Boissier and Simon* este teste avalia ansiedade nos animais assim como outros parâmetros como a memória espacial ou a memória de trabalho [10, 11].



Figura 7: Representação de um aparato utilizado no HB adaptada de [62].

Neste teste o animal é colocado numa arena (parecida com a do OF) perfurada. Tipicamente a arena de teste é um quadrado com 16 buracos equidistantes entre si. As medidas do teste não seguem um padrão de valores pré-definidos [11].

A ansiedade no HB é avaliada através de parâmetros relacionados com o modo como o animal explora a arena e os buracos que fazem parte desta. Ou seja, neste testes avalia-se uma decisão: se o animal introduz totalmente a cabeça no buraco ou se apenas explora a sua superfície. De acordo com estudos realizados a ansiedade nos animais correlaciona-se com o número de entradas nos buracos, neste teste, poucas entradas revelam grande ansiedade. Tal como no EPM, também aqui o medo de espaços desconhecidos entra em conflito com a curiosidade exploratória natural dos ratos [10, 11].

No âmbito desta experiência, nomeadamente o HB avaliou outros parâmetros para além da ansiedade, nomeadamente a memória de referência espacial. Assim, colocaram-se recompensas em alguns dos buracos do HB e permitiu-se que o animal explorasse o teste para encontrar as recompensas nos locais específicos. Ao realizar diversas sessões de testes em dias consecutivos com as recompensas sempre nas

mesmas posições, espera-se que o animal as encontre cada vez mais rapidamente em cada sessão. Sendo assim, é de esperar que os animais cronicamente stressados demorem mais tempo a encontrar as recompensas pois a capacidade de memorizar os locais onde estas se encontram poderá estar comprometida.

2.3 Análise de sinais neuronais

Esta secção descreve os conceitos fundamentais da análise espectral de sinais neuronais. Uma destas análises é a estimativa do espectro de frequências dos sinais neuronais. O espectro de frequências de um sinal é uma representação da amplitude do sinal no domínio das frequências. Para estimar o espectro de frequências de um sinal existem vários algoritmos entre os quais, a transformada de Fourier e o método de *multitaper*. Outra das ferramentas de análise de sinais neuronais é a coerência. A coerência avalia a sincronia entre duas áreas cerebrais. Matematicamente, a coerência é uma medida de correlação [53].

2.3.1 O espectro de frequências (Análise de *Fourier*)

Um sinal pode-se representar em dois domínios diferentes, nomeadamente no domínio do tempo e no domínio das frequências. É possível representar o sinal de um domínio para o outro utilizando a transformada de Fourier.

Enquanto no domínio do tempo o sinal é representado pela sua amplitude instantânea, no domínio da frequência o sinal é representado pela amplitude e fase de cada frequência do espectro. Sendo assim, estas duas representações são equivalentes, podendo-se transformar uma na outra através da transformada de Fourier ou da transformada inversa de Fourier [67].

A transformada de Fourier resulta do estudo das séries de Fourier onde um sinal periódico é descrito como a soma dos seus componentes básicos (harmónicos). A série de Fourier na forma exponencial referente a um sinal periódico $x(t)$ é:

$$x(t) = \sum_{k=-\infty}^{+\infty} a_k e^{j\omega_k t}$$

$$\omega_k = 2\pi f_k$$

onde Ω [rad.s⁻¹] representa a frequência angular e f_k [Hz] representa a frequência do k -ésimo harmónico e f_0 [Hz] é a frequência fundamental, isto é, é a frequência de $x(t)$. Os coeficientes a_k são dados por

$$a_k = \frac{1}{T_0} \int_{-T_0/2}^{+T_0/2} x(t) e^{-j\omega_k t} dt$$

ou seja, são necessário infinitos coeficientes a_k para representar um sinal periódico e contínuo no tempo.

A transformada de Fourier é um operador matemático que transforma um sinal numa projecção em termos dos seus componentes básicos (sinusóides), ou seja, permite representar o sinal no domínio das frequências, o gráfico desta representação é o espectro. Existe ainda a transformada discreta de Fourier (DFT) cujo algoritmo pode ser implementado de forma eficiente por via da transformada rápida de Fourier (FFT, do inglês *Fast Fourier Transform*). O algoritmo da FFT da DFT poder ser obtida a partir de sequencias de tamanho menor obtidas através da decomposição da primeira. Esta decomposição permite diminuir o número de cálculos efectuados (somas e multiplicações complexas), tornando-o mais rápido.

A equação da transformada de Fourier $X(\omega)$ para um sinal periódico e contínuo no tempo é então,

$$X(\omega) = \sum_{k=-\infty}^{+\infty} 2\pi a_k \delta(\omega - k\omega_0)$$

onde é $\delta(\Omega - k\Omega_0)$ representa um impulso de Dirac. Sendo assim, a transformada de Fourier de um sinal contínuo é um trem de impulsos separados de Ω_0 .

No entanto, os sinais analógicos (contínuos no tempo) não podem ser processados por um computador por ser necessária uma capacidade de memória infinita (infinitos coeficientes espectrais). Na prática, o sinal é amostrado, ou seja, é digitalizado. Para amostrar o sinal é necessário garantir que a frequência de amostragem do sinal deve ser sempre superior a duas vezes a frequência máxima contida no sinal. Esta frequência chama-se frequência de *Nyquist*. Caso esta regra não seja cumprida ocorre o fenómeno de alisamento (do inglês, *aliasing*) [50].

Depois de amostrado, o sinal é sinal discreto $x[n]$. Um sinal discreto e periódico pode ser descrito pelas seguintes equações,

$$x[n] = \sum_{k=0}^{N-1} a_k e^{-jk \frac{2\pi}{N} n}$$

$$a_k = \frac{1}{N} \sum_{n=0}^{N-1} x[n] e^{-jk \frac{2\pi}{N} n}$$

ou seja, ao contrario do que acontecia com os sinais contínuos, neste caso são necessários apenas N coeficientes espectrais para representar o sinal $x[n]$. A transformada de um sinal discreto designa-se de transformada de Fourier discreta, do inglês *Discrete Fourier Transform* (DFT).

Se a sequencia $x[n]$ for periódica então a transforma é dada por,

$$X'(\Omega) = \sum_{k=-\infty}^{+\infty} 2\pi a_k \delta(\Omega - k\Omega_0)$$

$$a_k = \frac{1}{N} X\left(k \frac{2\pi}{N}\right).$$

em que Ω é a frequência angular do sinal dada por 2π *frequência. Assim, a DFT de um sinal não periódico é um trem de impulsos espaçados de Ω_0 e de amplitude $2\pi a_k$ e de periodicidade 2π . Se a sequencia $x[n]$ for não periódica (com período 2π) a sua transformada é dada por,

$$X(\Omega) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} x[n] e^{-j\Omega n}.$$

A DFT decompõe as amostras do sinal no domínio do tempo em N sinusóides no domínio das frequências. O espectro do sinal contém então a informação sobre como a energia das várias componentes fundamentais se distribui no espectro das frequências [50, 67].

O espectro de potências e função de autocorrelação

O espectro de potências de um sinal descreve a distribuição da sua potência ao longo das frequências. De facto, a distribuição de energia e potência de um sinal oferece uma melhor descrição do mesmo. O espectro de potências (S_x) de um sinal aleatório (ou estocástico, como são os sinais electrofisiológicos cerebrais – LFPs) é calculado pela DFT da sua função de autocorrelação. A função de autocorrelação de um sinal (R_x) é o resultado da correlação de um sinal por ele próprio [55, 57].

Assim, a função de autocorrelação de um sinal $x[n]$ é dada por,

$$R_x(\tau) = \lim_{t_0 \rightarrow \infty} \frac{1}{t_0} \int_{-t_0/2}^{+t_0/2} x(t + \tau) x(t) dt$$

e sendo assim a transformada de Fourier de R_x é dada por,

$$S_x(f) = F[R_x(\tau)] = \int_{-\infty}^{+\infty} R_x(\tau) e^{-j2\pi f\tau} d\tau$$

esta equação aparece da aplicação teorema de *Wiener-Khintchine*.

Assim, a transformada de Fourier Inversa de S_x é R_x (função de autocorrelação do sinal $x[n]$).

$$R_x(\tau) = F^{-1}[S_x(f)] = \int_{-\infty}^{+\infty} S_x(f) e^{j2\pi f\tau} df$$

Assim, a potencia média do sinal é dada pela função de autocorrelação quando τ é igual a zero. Logo, a potencia média do sinal é dada pela seguinte equação,

$$P = R_x(0) = \left[\int_{-\infty}^{+\infty} S_x(f) e^{j2\pi f\tau} \right]_{\tau=0} = \int_{-\infty}^{+\infty} S_x(f) df$$

Janelas

A transformada de Fourier de um sinal sinusoidal continuo e infinito no tempo de frequência f_0 corresponde a um pulso na frequência f_0 do espectro. No entanto, é impossível do ponto de vista computacional processar um sinal infinito no tempo porque para tal seria necessária uma capacidade de memória infinita. É então necessário analisar o mesmo sinal mas num intervalo de tempo finito (ou seja multiplicando o sinal infinito por uma janela rectangular). No entanto a aplicação desta janela vai introduzir erros no cálculo espectral pois conduz ao aparecimento de componentes espectrais não nulas em outras regiões do espectro que não f_0 . Este fenómeno causado pela aplicação da janela, denomina-se de *leakage* e o seu efeito é mais severo nas frequências próximas de f_0 . Assim, este fenómeno pode interferir com a habilidade de distinguir as componentes espectrais reais do sinal. A escolha de uma janela rectangular é boa para sinais com uma baixa gama dinâmica (sinais compostos por sinusóides de amplitudes semelhantes) mas é inapropriada em sinais onde tal não acontece. Para estes sinais é necessário escolher outro tipo de janela [32].

Assim, como forma de reduzir o fenómeno de *leakage* existem outros tipos de janelas que podem ser aplicadas ao sinal. A aplicação da janela de *Hanning*, referido como o método clássico, reduz eficazmente o *leakage* e as frequências reais do sinal parecem tornar-se mais claras. Contudo, este método introduz outros problemas na análise. A aplicação desta janela reduz a informação contida nos dados, especialmente nos últimos pontos da janela uma vez que estes são forçados a zero. A janela *Hanning* encontra-se representada na Figura 8a.

O método MTM

O *Multitaper Method* (MTM) é um método para estimativa do espectro de um sinal e para a sua reconstrução [65]. Este método é amplamente utilizado em várias áreas científicas pois permite uma estimativa do espectro de um sinal além da sua reconstituição no domínio do tempo. O MTM é um método que procura diminuir a variância na estimativa do espectro utilizando um conjunto de *tapers* (janelas) ao invés de uma só janela contendo todos os dados (tal como é feito noutros métodos). O cálculo com recurso a *tapers* é um método que consegue o equilíbrio entre minimização da variância e maximização de resolução espectral para a estimativa do espectro do sinal. Outra vantagem do cálculo através do método MTM é este ser bastante robusto contra enviesamentos (do inglês *bias*). Os primeiros *tapers* do método MTM estão representados na figura 8b.

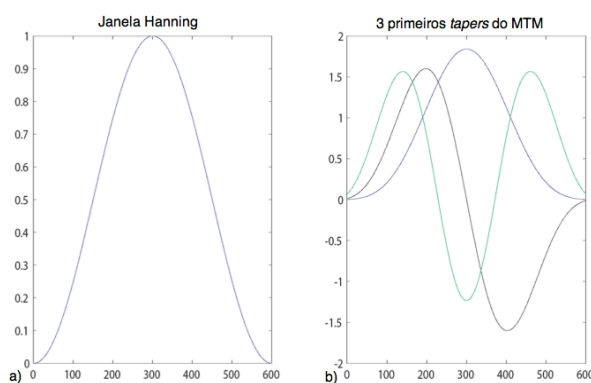


Figura 8: a) Representação da janela de *Hanning* b) Representação dos 3 primeiros *tapers* utilizados no método MTM (adaptado de [32]).

Assim, os dados a analisar são multiplicados por um conjunto determinado de *tapers* ortogonais, minimizando o impacto do fenómeno de *leakage* espectral. Os *tapers* mais apropriados são os denominados de valores próprios (do inglês, “*eigentapers*”) os

quais pertencem a uma família de funções denominada de *discrete prolate spheroidal sequences* (DPSS) que são definidas como os valores próprios (*eigenvectors* que solucionam o problema *Rayleigh-Ritz*. Relativamente aos métodos tradicionais de estimativa espectral (e.g. FFT) a média da estimativa do espectro com recurso a *tapers* (ao invés de um único *taper*) melhora o problema de *leakage* e diminui a variância na estimativa do espectro do sinal. Os *tapers* utilizados são então um conjunto discreto de *eigenfunctions* que resolvem o problema da minimização do *leakage* espectral fora de uma banda de frequências de metade da largura de banda pf_n onde $f_n=1/Ndt$ é a frequência de *Rayleigh* [44].

Os primeiros $2p-1$ *tapers* aplicados ao sinal visam diminuir o *leakage* espectral pelo que o número de *tapers* utilizados (k) nunca deve ser inferior a $2p-1$. É desta escolha de k e da largura de banda $2pf_n$ que advém o compromisso entre resolução espectral e estabilidade da estimativa do espectro. Uma escolha típica de *tapers* em análise de dados climáticos, por exemplo, é $k=3$ e $p=2$ porque é a combinação que oferece o melhor compromisso entre resolução espectral e baixa variância na estimativa do espectro para este tipo de dados. Para conjuntos de dados maiores pode ser utilizado um número k maior mantendo a mesma resolução espectral. Sendo assim, a escolha de uma combinação k e p é dependente do tipo de dados a analisar [44].

Depois de escolhidos calculados os k *tapers* ($w_k(t)$) para largura de banda escolhida, o espectro, P_x , é estimado utilizando a média de cada estimativa individual para cada versão do sinal $x(t)$ escolhida por cada um dos k *tapers*. O espectro de alta resolução calculado através do MTM é dados pela soma pesada dos k *eigenspectra*,

$$P_x(f) = \frac{\sum_{k=1}^K \mu_k |X_k(f)|^2}{\sum_{k=1}^K \mu_k}$$

onde X_k é a DFT de $x(t) \cdot w_k(t)$.

Ajustando os pesos relativos da contribuição de cada k *eigenspectra* de modo a tornar o método de estimativa do espectro mais resistente a *leakage* obtém-se a seguinte equação de estimativa do espectro adaptativo,

$$P_x(f) = \frac{\sum_{k=1}^K b_k^2(f) \mu_k |X_k(f)|^2}{\sum_{k=1}^K b_k^2(f) \mu_k}$$

onde $b_k(f)$ é a função de pesagem relativa. A estimativa de espectro adaptativo tem um grau de liberdade efectivo que geralmente se afasta ligeiramente do valor nominal $2k$ do espectro *multitaper* de alta resolução k [44].

2.3.2 Coerência entre sinais

Em física, a coerência quantifica as propriedades de correlação entre duas formas de onda. Um modo fácil de entender a coerência é pensar no que acontece quando duas formas de onda interferem. Estas podem interferir em fase (interferência construtiva) ou em oposição de fase (interferência destrutiva) e criar uma nova forma de onda cuja amplitude pode ser maior/menor consoante o valor da fase relativa dos sinais. Sendo assim, a coerência mede o quão perfeitamente duas ondas se podem destruir mutuamente quando interferem.

A coerência entre dois sinais é então medida pela função de correlação cruzada entre os dois sinais no domínio das frequências. Esta função quantifica a capacidade de prever o valor da segunda onda sabendo o valor da primeira. Sendo assim quando duas funções estão perfeitamente correlacionadas quando uma se altera da mesma forma que a outra e simultaneamente as duas apresentam um padrão de interferência construtiva em todos os momentos. Neste caso, as suas ondas são perfeitamente coerentes [44].

Matematicamente a coerência é dada pela seguinte equação,

$$C_{xy}(f) = \frac{|P_{xy}(f)|^2}{P_x(f)P_y(f)}$$

A coerência entre os dois sinais dada por $C_{xy}(f)$ só pode tomar valores entre 0 e 1 e é uma função da frequência (f). As quantidades P_x e P_y representam a estimativa do espectro de frequências de cada um dos sinais individualmente e P_{xy} representa o espectro cruzado dos dois sinais [44].

Na prática, o calculo da coerência é feito utilizando o método MTM com k *tapers* para a estimativa da DFT individual de cada sinal, X_k e Y_k ,

$$C_{xy}(f) = \frac{\left| \sum_{k=1}^K \mu_k X_k(f) \cdot Y_k^*(f) \right|^2}{\sum_{k=1}^K \mu_k |X_k(f)|^2 \sum_{k=1}^K \mu_k |Y_k(f)|^2} .$$

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenvolveu-se uma plataforma capaz de processar, de uma forma integrada, sinais neuronais e também dados de comportamento. A plataforma foi desenvolvida e testada com recurso a um conjunto de sinais neuronais, os quais foram adquiridos seguindo-se o protocolo descrito em Anexo 2 para animais cronicamente implantados e em movimento livre. A aplicação foi testada para análise das diferenças electrofisiológicas entre um grupo de animais de controlo e um grupo de animais sujeitos a um protocolo de stress crónico (capítulo 4).

O programa desenvolvido analisa os dados extraídos dos testes de comportamento tanto ao nível neuronal (LFPs) como ao nível do comportamento. A análise neuronal comporta o cálculo de coerências e espectros de potência, enquanto a análise comportamental comporta o cálculo do tempo passado em cada região do teste de comportamento bem como o cálculo do número de cruzamentos ou entradas efectuados dentro de cada região. Estas duas análises são complementares e podem efectuar-se em conjunto ou em separado. Nas gravações basais, onde o animal não está a desempenhar nenhuma tarefa específica, o programa permite apenas a análise neuronal (espectros e coerências) em períodos de tempos seleccionados manual ou automaticamente.

A plataforma para implementação do sistema foi o *Matlab*. Esta plataforma é amplamente utilizada em cálculos de engenharia e científicos dada a facilidade de criar, depurar e testar programas, a facilidade de manipular matrizes, a possibilidade de criar GUI (interfaces gráficas com o utilizador) e dada a grande variedade de funções agrupadas em *Toolboxes*. Muitas destas funções resultaram da contribuição de milhares de utilizadores em todo o mundo. Uma vantagem na utilização do *Matlab* é o código desenvolvido é independente do sistema operativo utilizado. Uma desvantagem é o facto de ser mais demorado de executar do que o código escrito noutras linguagens

(como o caso do C ou C++). Foi também no *Matlab* que se desenvolveu a interface gráfica com o utilizador. A interface foi desenvolvida através de uma função denominada GUIDE. A interface permite que o utilizador use de forma mais intuitiva as funções desenvolvidas [51, 64].

A navegação entre as diversas funções do programa faz-se com recurso a uma interface gráfica. Nesta aplicação, a interface permite que o utilizador insira o número de animais a analisar assim como o número de grupos e o nome dos mesmos. É também na interface que o utilizador define não só o tipo de análise a realizar sobre os dados, nomeadamente análise neuronal (coerências e espectros), análise comportamental ou ambas. É possível ainda inserir alguns parâmetros específicos da análise em causa.

No desenvolvimento desta aplicação de processamento de sinais neuronais utilizou-se uma *toolbox*, o *Chronux* [2]. O *Chronux* é um software *open-source* desenvolvido através da contribuição de diversos grupos de investigação e destina-se à análise de dados neuronais no domínio do tempo e das frequências. Esta biblioteca contém funções úteis para o processamento de sinais neuronais contínuos no tempo, como são os LFPs e o Electroencefalograma (EEG), mas também sinais pontuais como são tipicamente os *spikes*. As duas funções retirados do *chronux* mais importantes para o desenvolvimento deste programa foram a que calcula de coerência entre dois sinais neuronais contínuos no tempo e a que calcula o espectro do sinal no domínio das frequências através do método *multi-taper* (MTM - *Multi-Taper Method*) [2, 65].

Seguidamente descrevem-se os métodos utilizados para aquisição do sinal (secção 3.2) e uma descrição suscita o protocolo de gravações (secção 3.1). Serão também descritos os métodos aplicados para a extracção de espectros de potencia (secção 3.5.1) e coerências (secção 3.5.2) do sinal neuronal gravado. Este cálculo do espectro de potência e da coerência pode-se aplicar apenas em segmentos do sinal escolhidos de forma manual (3.3.1) ou automaticamente (secção 3.3.2). Outro dos resultados apresentados pelo programa é a análise do comportamento que é baseada na segmentação automática dos respectivos testes de comportamento (secção 3.4).

3.1 O protocolo de gravações

Durante 21 dias gravou-se a actividade basal (quando nenhuma tarefa de comportamento é realizada) de todos os animais. O protocolo completo de gravações basais pode ser encontrado em Anexo 2.

As gravações dos LFPs dos dois grupos, stressados e de controlo, aconteciam em dias separados, tendo sido realizadas duas sessões de gravações por dia, uma de manhã e outra de tarde. Estas duas sessões de gravação foram assim escolhidas para aferir se a variação circadiana dos níveis de corticoesteróides no sangue dos animais teria influência nos sinais electrofisiológicos registados. Assim as gravações da manhã (9-12h) aconteciam num período de baixo nível de corticoesteróides (vale), enquanto as gravações da tarde (17-20) aconteciam num período de elevada concentração de corticoesteróides (pico).

Durante os mesmo dias aplicou-se o protocolo de stress (CUS) nos animais do grupo de stress. Este protocolo encontra-se descrito em Anexo. Terminados os 21 dias de aplicação do protocolo de stress e de gravações do estado de actividade basal, os ratos foram então sujeitos aos testes de comportamento. Os primeiros testes efectuados foram o *open field* e o *elevated plus maze*. Para a realização dos testes seguintes (*hole board* e *t-maze*) foi necessário um dia de habituação ao teste e foi também necessário colocar os animais em privação de comida. Esta privação é necessária para motivar o animal a realizar o teste, pois envolvem uma recompensa sob a forma de comida.

3.2 O Sistema de aquisição do sinal

O sistema de aquisição utilizado foi o dacqUSB (*Axona Ltd, Reino Unido*) o qual é composto pelo *hardware* de aquisição e amplificação do sinal e pelo *software* de gravação, *tracking* e vídeo [3]. O *hardware* de aquisição é composto por uma unidade de amplificação (que amplifica o sinal adquirido) e uma unidade de conversão analógica-digital (ADC) (para converter o sinal analógico amplificado num sinal digital de forma a ser processado por um computador). O *software* do sistema permite a recolha dos dados neuronais e a sincronização dos mesmos com imagem de vídeo-*tracking*. A Figura 10 representa o diagrama de blocos do sistema de aquisição de sinal. A unidade de amplificação ligada a um *headstage* por um cabo flexível isolado que funciona como um pré-amplificador. O *headstage* liga-se aos eléctrodos através de um conector *Mill-max* TM com receptáculos de ouro que está externamente liga aos eléctrodos implantados e apresenta um pequeno circuito onde se faz pré-amplificação do sinal. O implante no cérebro do rato é feito utilizando eléctrodos de fio único (*single-wire*) de Níquel-Crómio (liga de Níquel a 80% e Crómio a 20%) com diâmetro de 66

μm . O Níquel-Crómio apresenta elevada resistividade e elevada resistência à oxidação graças ao revestimento de *formvar*®.

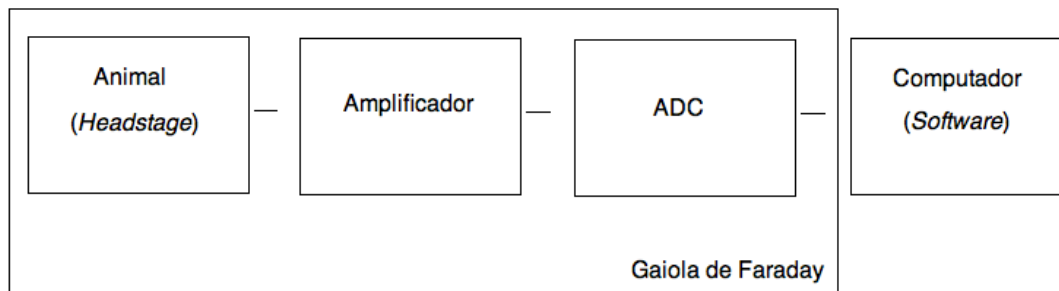


Figura 9: Representação do Diagrama de Blocos do sistema de aquisição do sinal

No sistema de aquisição, a frequência de amostragem foi de 24 kHz, tendo sido posteriormente reduzida por decimação para 1200 Hz. O sistema de aquisição permite acompanhar (do inglês *tracking*) a posição do animal de acordo com os níveis de cinzento do vídeo adquirido. Neste caso optou-se por fazer o acompanhamento de um LED (Díodo Emissor de Luz) na gama dos infravermelhos, o qual estava colocado no *headstage* (devolve as posições adquiridas a uma frequência de amostragem de 20 Hz num ficheiro texto). Um dos problemas encontrados neste método foi que por vezes pode perder-se a posição do animal (devido a reflexos ou zonas mais claras na imagem que podem confundir-se com o LED) e neste caso, a variável que guarda a posição do LED toma o valor máximo possível (neste caso 1023). Quando isto acontece, assume-se sempre o valor válido imediatamente anterior. Quando o sistema de acompanhamento da posição do animal se perde logo no início da sessão de gravação e não existe posição anterior para assumir, procura-se a primeira posição válida do ficheiro e assumida para as primeiras posições inválidas. O sistema de aquisição produz também um vídeo sincronizado com a aquisição do sinal neuronal para acompanhar de a partir do exterior o comportamento dos ratos. Isto é efectuado nos vários testes de comportamento sem interferir com os mesmos. O vídeo pode ser gravado para posterior observação e análise.

Um dos problemas mais comuns existentes na aquisição de sinais de baixa amplitude (isto é, tipicamente na ordem dos μV) como é o caso dos LFPs, é o facto de estes serem muito afectados pelo ruído electromagnético. Este ruído pode ter origem em outros equipamentos (e.g. motores, iluminação), em ruído proveniente das linhas de alimentação (onde ocorre uma distorção nas componentes espectrais do sinal na banda dos 50 Hz) ou proveniente das ligações à terra (quando ocorrem, por exemplo, *ground*

loops e há corrente a circular entre terras que deveriam ser supostamente independentes). Para evitar ao máximo as interferências referidas, todas as gravações foram efectuadas com o *hardware* (à excepção do computador) dentro de uma gaiola de Faraday quadrada de 2x2x2 m³ de volume (de modo a minimizar as interferências resultantes do ruído electromagnético) e alimentado por uma fonte de tensão ininterrupta (UPS - *uninterruptible power supply*) *online* com correcção do sinal de saída para se obter uma tensão de entrada estável.

3.2.1 Os implantes

O implante de cada animal é constituído por 7 eléctrodos de Níquel-Crómio mais um eléctrodo de aço inoxidável em forma de parafuso (utilizado como a terra do animal). Os eléctrodos foram implantados nas zonas CA3 do hipocampo dorsal e ventral e também na zona pré-límbica do córtex pré-frontal (tanto no hemisfério esquerdo como no hemisfério direito do cérebro). Para além destes seis eléctrodos, colocou-se um eléctrodo de referencia na zona do cérebro correspondente à zona sensorial dos membros posteriores. As coordenadas de posição dos eléctrodos (de acordo com o *Rat Brain Atlas* [52]) são para o córtex pré-frontal: 3.3 AP, +- 0.8 e ML, -4.0 DV. No caso do hipocampo dorsal: -3.9 AP, +- 2.2 e ML, -2.4 DV. No hipocampo ventral: -5.1 AP, +- 5.4 ML e -7.4 DV. Para o eléctrodo de referencia têm-se: -3.0 AP, -1.5 ML, e -2.0 DV e finalmente para o parafuso-terra as coordenadas são: -10.5 AP, e 0.0 ML.

3.3 O sistema de Segmentação do sinal

Tal como já foi referido, o sinal proveniente das gravações pode ser analisado em segmentos. Estes segmentos podem ser seleccionados manualmente ou podem ser extraídos de forma automática pelo *software*. Ambos os métodos de selecção manual e automática serão descritos nos pontos seguintes.

3.3.1 Manual

Na selecção manual de segmentos do sinal o utilizador deve preencher um ficheiro com extensão XLS com os períodos do sinal que pretende analisar. Este ficheiro .XLS contém quatro colunas e o número de linhas igual ao número de períodos a analisar. Nas colunas indica-se, pela seguinte ordem: minuto inicial, segundo inicial,

minuto final e segundo final. Este ficheiro é introduzido no *software* a partir da interface gráfica e deve conter tantas folhas como gravações que se está a analisar.

3.3.2 Método de Segmentação Automática

No programa desenvolvido existe a possibilidade de segmentação automática dos sinais neuronais. Esta segmentação, efectuada a partir da análise das posições obtidas por *tracking*, permite que o programa seleccione de forma automática períodos do sinal neuronal em que o animal se encontre a realizar uma determinada tarefa de interesse.

A segmentação automática deve obedecer a um determinado critério pré-estabelecido que é diferente de acordo com o tipo de teste a que corresponde a gravação que se está a segmentar. É possível utilizar a função de segmentação automática para os dados provenientes das gravações basais (quando o animal se encontra no seu alojamento habitual e nenhuma tarefa é requerida) e quando o animal se encontra a realizar testes de comportamento como é o caso do *Open Field* (OF), *Elevated Plus Maze* (EPM) , *T-maze* e *Hole Board* (HB) ou estão a explorar uma arena familiar (gravações basais). Seguidamente descrevem-se os diferentes critérios para cada teste e os métodos aplicados para a extracção automática de segmentos.

Uma das características principais do *software* desenvolvido é este permitir analisar integradamente os dados do comportamento. Sendo assim, a segmentação automática foi utilizada, no OF e no EPM para se extrair os gráficos automáticos de comportamento com cada um dos parâmetros necessários a fim de avaliar o comportamento e efectuar a correlação com os resultados da electrofisiológica (análise dos dados neuronais).

Actividade Basal

A actividade basal do animal foi sujeita a segmentação automática. Nesta segmentação parte-se de um ficheiro de texto onde estão armazenadas as coordenadas do *tracking* do animal ao longo do tempo. Neste tipo de segmentação pretende-se encontrar os períodos de tempo em que o animal se deslocou ao longo da caixa com velocidade aproximadamente constante. O algoritmo exclui deste tipo de actividade os momentos em que o animal se encontrava parado, a rodar sobre si próprio ou de pé.

Sendo assim, calculou-se o deslocamento de um ponto ao outro a partir das posições de *tracking*. O deslocamento foi calculado com base na seguinte formula matemática

$$d = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}$$

em que x_1 e x_2 são as coordenadas em x das posições inicial e final, respectivamente, e y_1 e y_2 são as coordenadas em y das mesmas posições.

A primeira posição do ficheiro é considerada a referência quando o algoritmo é iniciado. Seguidamente, é calcula-se o deslocamento desde a posição de referencia até à segunda posição no ficheiro e assim sucessivamente para as posições seguintes. Quando a distancia entre dois pontos menos a distancia entre os dois pontos anteriores for superior a um determinado limiar (*threshold*) considera-se que houve uma mudança no sentido do movimento do animal. A posição onde se dá a mudança de sentido é guardada e passa a ser considerada a posição de referencia. O algoritmo é executado para todas as posições do ficheiro, marcando-se desta forma todas as mudanças de direcção. O *threshold* exclui os momentos em que o rato rodou a cabeça para traz ou fez outro tipo de movimento que originou que a distancia percorrida descesse mas não sendo movimentos em que tenha existido mudança no sentido de deslocamento.

Depois de marcadas as todas as mudanças de direcção, calcula-se a velocidade em janelas entre mudanças de direcção. Consideram-se janelas de 50 pontos, sendo que em cada uma delas calcula-se a velocidade através da divisão entre a distância percorrida, entre o primeiro e o último ponto da janela, e o tamanho da janela em milissegundos (multiplicação do número de pontos da janela pelo tempo de amostragem ($1/f_a$) que neste caso são 5 ms).

Depois de calculados os vectores com a distância percorrida e a velocidade em cada janela, retiram-se os segmentos com base em *thresholds*. Calcularam-se este dois parâmetros a partir de ficheiros anteriormente segmentados de forma manual, tendo sido extraídos os valores de *threshold* adequados.

Aplicou-se uma suavização nas posições obtidas através do *tracking* para melhorar os resultados deste algoritmo de segmentação automática. Esta suavização é feita através da média de 5 posições. Assim, a cada posição do *tracking* (x, y) passa a corresponder a média as 5 posições a sua volta. Este filtro média funciona na prática

como um filtro passa-baixo, permitindo a eliminação de variações rápidas de posição, causadas por exemplo por rápidos movimentos da cabeça do animal.

Para melhor compreensão, os algoritmos implementados para o calculo das distâncias e velocidades ao longo do ficheiro das posições do *tracking* pode-se consultar no Anexo 1.

Open Field (OF)

O aparato do OF está representado na Figura 10, sendo composto por uma caixa cinzenta, quadrada, com 50 centímetros de lado. O rato é colocado no teste na região central. O teste tem a duração de 5 minutos e é realizado apenas uma vez com cada animal.

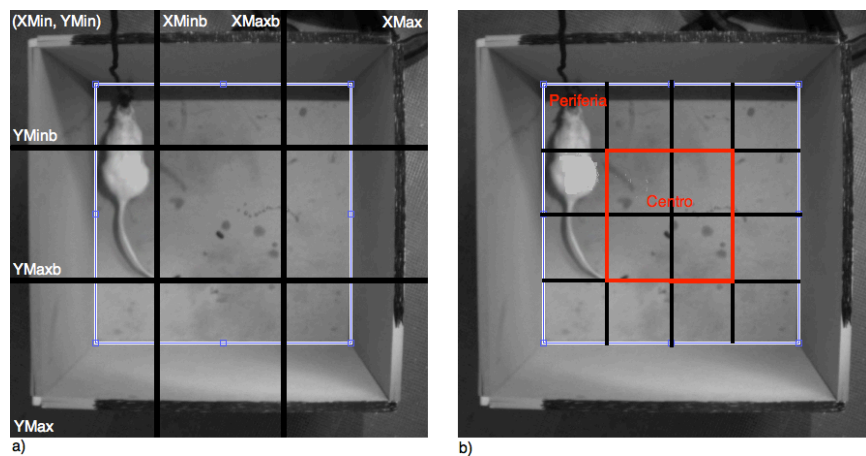


Figura 10: a) Em azul encontra-se o quadrado marcado pelo utilizador para definir a zona do Open Field e a preto os limites calculados pelo algoritmo para as duas zonas do Open Field. b) A vermelho encontra-se marcada a separação entre a zona central e periférica do Open Field e as linhas a preto indicam as subdivisões de casa área feitas pelo algoritmo.

O objectivo é segmentar os períodos de tempo em que o animal está na periferia e os períodos em que o animal está no centro do teste. Esta segmentação permite efectuar o cálculo das coerências e espectros dos sinais neuronais quando o animal está em cada uma das regiões do OF. Esta separação permite avaliar se existem diferenças electrofisiológicas entre os períodos em que animal está no centro do OF ou quando está na periferia do OF. O método de calculo de coerências e espectros do sinal para estes períodos encontra-se explicado na seção 3.5.

Para segmentar o sinal proveniente dos testes no OF é necessário saber os limites de cada uma das regiões. Para saber os limites do *Open Field* é necessário que o utilizador retire uma *frame* do vídeo (gravado de forma sincronizada com a gravação). A interface gráfica permite que o utilizador importe a *frame* do vídeo e que sobre ela

trace o referido quadrado (tal como aparece na Figura 10 a). Foi criada uma função que tem como parâmetros de entrada o ficheiro onde se encontra guardada a *frame* do vídeo e o número de quadrados que se quer traçar por cima da imagem (neste caso será apenas 1). Para traçar o quadrado por cima da imagem utilizou-se uma função da biblioteca do *Matlab* denominada *imrect*. Esta função permite desenhar um quadrado por cima de uma imagem e devolve a distância entre os vértices do rectângulo desenhado. Quando a imagem aparece é necessário que o utilizador trace um quadrado por cima da mesma até que este seja satisfatório (ou seja até que cubra a totalidade da área onde o animal se movimenta). Quando isto acontece dá-se duplo clique num dos vértices do quadrado. Posto isto, o programa divide o lado desse quadrado principal em 4 e guarda os limites da periferia e do centro (em pixéis). A zona central é um quadrado (Figura 10b) com lado igual a 2 vezes o resultados da divisão do quadrado traçado pelo utilizador (Figura 10a) por 4. A zona periférica é a zona circundante a este quadrado que se encontra inscrita no quadrado principal. Os limites do Open Field calculados pelo *software* são guardados num vector (ver Figura 10a).

No *Open Field* a segmentação das posições do ficheiro de texto resultante do *tracking* do LED instalado no *headstage* do animal é feita de acordo com a posição do mesmo. Sendo assim, existe uma função que, para cada posição indica a região do OF em que o animal se encontra. Correndo esta função para todas as posições do ficheiro consegue-se obter um vector com um número de valores igual ao número de posições do ficheiro de *tracking*. Em cada uma das posições deste vector encontra-se a região do OF à qual essa posição corresponde. Se for 0, a posição pertence à periferia senão, se for 1 pertence ao centro.

Foi implementada uma função para análise de uma dada a região de interesse (passada como argumento de entrada), a qual retira deste vector as posições em que o *tracking* estava na referida região de interesse (centro ou periferia). Após a retirada de todos os segmentos, a função verifica em que minuto, segundo e milissegundo começa e acaba cada um dos segmentos. Sendo assim, a variável de saída será uma matriz com 6 colunas, correspondendo as primeiras 3 correspondem, respectivamente, ao minuto, segundo e milissegundo em que o animal entrou na região de análise. As últimas 3 colunas correspondem às mesmas medidas mas agora relativas ao instante em que o animal abandona a região de interesse. Esta matriz terá tantas linhas quantas entradas o animal efectuou na referida região do OF. A segmentação nos restantes testes de comportamento efectua-se da mesma forma, alterando-se apenas o critério de

segmentação. O algoritmo de segmentação automática de cada vector de posições pode ser consultado no Anexo 1.

Análise de comportamento no *Open Field* (OF)

Outro objectivo da segmentação é a análise do comportamento. Os dois parâmetros importantes para analisar o comportamento de um animal no OF são: o tempo total que o animal passou em cada uma das regiões do teste e o número de cruzamentos dentro da mesma região e o número de cruzamentos total. O número de cruzamentos é dado pelo número de vezes que o animal cruzou uma linha (ver Figura 10) divisória dentro de uma determinada região da arena. O número de cruzamentos total é dado pela soma dos cruzamentos dentro de cada uma das regiões.

A segmentação automática está directamente relacionada com a avaliação do comportamento, pois é a partir dos dados da segmentação que se extrai o tempo que cada animal passa numa determinada região do teste. Através dos segmentos converte-se então o tempo inicial (quando o animal entrou na área) e o tempo final (quando o animal saiu) em segundos e subtrai-se o inicial ao final de modo a converter o total em segundos que o animal passou nessa área. Seguidamente volta-se a converter este valor em minutos para maior facilidade de interpretação dos resultados.

Outra das saídas da análise automática é a contagem do número de cruzamentos que o animal efectuou ao longo da gravação dentro de uma determinada região do teste (tendo em conta os limites calculados das regiões do OF e as subdivisões efectuadas dentro de cada região). A subdivisão da *arena* é um método padrão para avaliar o comportamento do animal dentro do teste. Muitas vezes, o próprio aparato do OF utilizado nas experiências já apresenta estas marcações feitas. No entanto, o aparato utilizado no âmbito destas experiências não as apresenta, pelo que estas marcações apenas são efectuadas ao nível do *software*. Sendo assim, os cruzamentos contabilizam o número de vezes que o animal cruzou uma subdivisão dentro do centro ou dentro da periferia. Para esta contagem assumiu-se que os cruzamentos da periferia para o centro contam como cruzamentos no centro e os cruzamentos do centro para a periferia contam como cruzamentos na periferia.

Para procurar os cruzamentos efectuados ao longo do teste utiliza-se uma função que atribui um número a cada um dos pequenos quadrados que divide cada uma das regiões do OF (Figura 10b). Assim, no centro tem-se 4 quadrados e na periferia 12.

Existe uma função que, a partir de duas posições do *tracking* indica se e que tipo de cruzamento existiu. O algoritmo desta função encontra-se representado no anexo A1.

A função de contagem do número de cruzamentos percorre o vector de posições completo e para cada par de posições aplica o algoritmo anterior. De acordo com o resultado incrementa-se 1 à contagem dos cruzamentos na periferia, nos cruzamentos no centro ou em nenhum. Sendo assim, para cada animal a função devolve um relatório onde se indicam os segmentos extraídos, tempo decorrido e o número de cruzamentos em cada uma das regiões do teste (centro e periferia).

Elevated Plus Maze (EPM)

O EPM está representado na Figura 11. O aparato apresenta uma elevação e um comprimento de braços de 50 centímetros. Cada braço tem uma largura de 10 cm, existindo uma área central com 10x10 cm. Neste teste, o animal é colocado no aparato na parte central e orientado para a frente de um dos braços abertos. O teste tem a duração de 5 minutos e é feito apenas uma vez para cada animal.

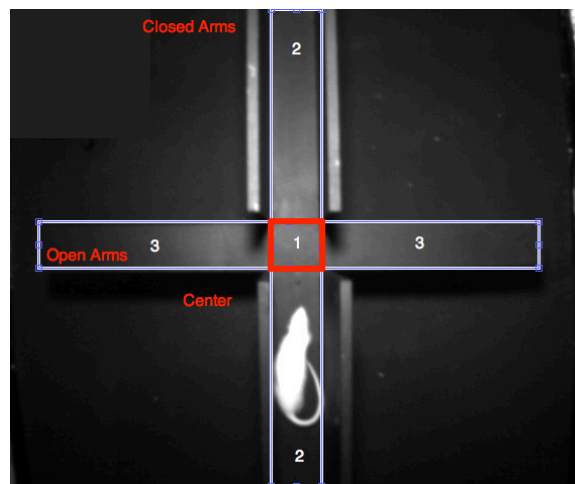


Figura 11: representação do aparato utilizado no EPM onde se encontram marcadas (a azul) os limites do teste definido pelo utilizador, a vermelho as varias regiões do teste e o número correspondem a cada uma delas que é atribuído pelo programa.

A segmentação no EPM pode ser realizada automaticamente. O primeiro objectivo da segmentação é separar os períodos de tempo em que o animal esteve nas três diferentes regiões do teste, que são: centro, braços fechados e braços abertos. A segmentação no EPM é feita de acordo com a posição.

Para segmentar os dados do EPM segundo a posição é necessário identificar-se no sistema quais são os limites das 3 zonas da cruz. Para isso, o método utilizado é em tudo semelhante ao utilizado no OF. Isto é, retirou-se do vídeo uma *frame*, e marcados

dois quadrados, com uma função do *Matlab* (a mesma utilizada para o caso do OF), para definir: os braços abertos (para cima e para baixo), os braços fechados (para a esquerda e para a direita) e a zona da intersecção entre os dois que será a zona central do teste. É importante que na imagem inserida os braços abertos sejam identificados em primeiro lugar para a segmentação ser correcta. Depois de este processo ser realizado o resultado deverá ser o indicado pelas linhas azuis na imagem da Figura 11.

Depois de marcados correctamente os limites da cruz e importados os dados referentes às posições e aos tempos de aquisição, os dados são segmentados. A segmentação é efectuada no EPM com o mesmo algoritmo utilizado no OF. Neste caso, a existência 3 zonas diferentes é usada uma função que, tendo em conta os limites de cada zona e uma posição do *tracking* retorna a zona pertencente a esta posição. Executa-se esta função para todas as posições e obtém-se um vector com tantas linhas como posições onde está a zona a que cada posição pertence. A função de segmentação procura neste vector uma região específica, por exemplo, os braços fechados. Procura todos os segmentos e retorna o tempo que o animal passou nessa zona e os tempos (minuto, segundo e milésimo de segundo) de entrada e saída dessa zona. Quando o sinal está correctamente segmentado, calculam-se as coerências e os espectros dos sinais para as áreas cerebrais que o utilizador pretende analisar. Este calculo é realizado segundo a explicação na secção 3.5.

Apesar de serem raros, existem casos em que o *tracking* produz posições que não se encontram em nenhuma das zonas previamente delimitadas para o EPM. Isto acontece, por exemplo, quando o animal salta para fora do teste e é necessário recolocá-lo no mesmo. Mesmo sendo raros, estes momentos estão contemplados no *software* de análise para evitar a existência de erros. Nestas situações assume-se que o tempo que o animal esteve “perdido” foi passado na última zona onde o animal se encontrava antes de isso acontecer.

Análise automática de comportamento no *Elevated Plus Maze* (EPM)

A análise comportamental no caso do EPM comporta a extração de dois parâmetros importantes, o número de entradas nos diferentes tipos de braços da cruz (abertos e fechados) e o tempo despendido pelo animal dentro das três diferentes zonas do teste, ou seja, centro, braços abertos e braços fechados.

Sendo assim, o cálculo do tempo despendido em cada uma das regiões do teste é feito a partir dos dados da segmentação automática. Da função de segmentação resulta um vector com o minuto, segundo e milissegundo em que o animal entrou e saiu de uma determinada região do testes. Efectuou-se o calculo do tempo despendido em cada segmento e após a soma do tempo de todos os segmentos obtém-se o tempo total que o animal passou nessa região do teste. A extracção automática de segmentos encontra-se explicada na secção 3.2.2.

Outro parâmetro importante para a analise de comportamento no EPM é a contagem do número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados. Utilizou-se um vector onde se encontrava a região correspondente a cada posição para marcar as passagens entre diferentes regiões do teste. Assim, a cada região atribuiu-se um número de 1 a 3 em que 1 é o centro, 2 são os braços fechados e 3 são os braços abertos. Deste modo existe uma função que indica em que região o teste se encontra, tendo em conta cada uma das posições do ficheiro.

Executando uma função que, para cada posição procura o local do teste obtém-se um vector (com número de linhas igual ao número de posições) onde se encontram números de 1 a 3 correspondentes a cada região. Posto isto, se a diferença entre uma posição e a posição anterior for igual a 2 significa que houve uma passagem para os braços abertos, se a diferença for igual a 1 então houve uma passagem para os braços fechados, se não houver diferença não houve nenhuma passagem (o rato manteve-se na mesma região). O algoritmo utilizado para verificar o tipo de cruzamento no EPM encontra-se no Anexo A1. Aplica-se então este algoritmo para todas as posições do ficheiro gerando-se um vector onde estão marcados todos as entradas. No final contam-se as ocorrências do número de 2 no vector e têm-se o número de entradas nos braços abertos. Procede-se da mesma forma para o número de entradas nos braços fechados, isto é, somam-se os dois valores e têm o número de entradas total.

T-Maze

O teste de comportamento *T-Maze* (representado na Figura 12) é composto por uma caixa com o formato de uma cruz em forma de T.

Este teste é efectuado em *trial*. Cada um deles é composto por duas fases distintas. Na primeira parte do *trial* (Figura 12a), o animal parte da caixa inicial (quando a primeira porta é aberta) e quando chega à zona central do teste uma das duas portas encontra-se fechada. Então, o animal entra no braço cuja porta ficou aberta e encontra a

recompensa. Na segunda parte do *trial* (Figura 12b) o animal parte mais uma vez da sua caixa inicial e quando chega à região central ambas as portas estão abertas. Se o animal escolher a porta correcta (de acordo com uma regra) recebe a recompensa. O objectivo é o animal aprender (ao longo dos vários *trials*) a regra associada à abertura das portas. Esta regra pode ser: a recompensa estar localizada na porta que no primeiro *trial* esteve fechada ou estar localizada na mesma porta. Ao longo dos *trials* é acrescentado um outro factor ao teste, isto é, acrescenta-se um pequeno tempo de espera antes da abertura da primeira porta (este tempo vai aumentando ao longo de *trials* consecutivos).

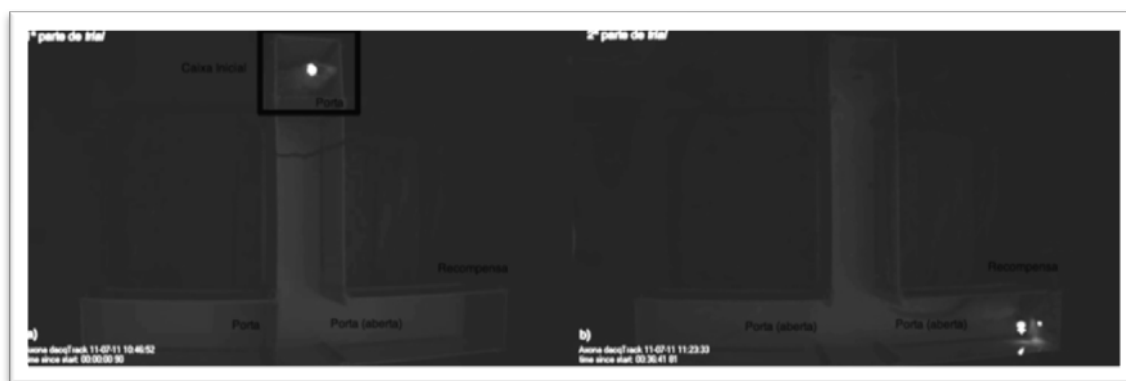


Figura 12: a) Representação do teste de comportamento *T-Maze* quando o animal se encontra a realizar a 1 fase do *trial*. b) Representação do teste de comportamento *T-Maze* quando o animal se encontra a realizar a 2 fase do teste do *trial*.

A segmentação no *T-Maze* incluída na aplicação desenvolvida comporta uma parte manual e uma parte automática. A segmentação manual permite que o utilizador defina o início e o fim de cada *trial* (o início do *trial* acontece quando o utilizador abre a primeira porta do teste e acaba quando o animal encontra a comida). O utilizador deve definir quais são as fases dos *trials* e caso sejam a segunda fase, quais os *trials* que animal acertou ou errou.

Implementou-se a segmentação manual porque a segmentação automática dos *trials* implicava para cada um a existência de um grande esforço de programação quando comparado com o esforço de segmentar a mão. Este esforço advém do facto de a trajectória do animal no *trial* nem sempre ser aquela que se espera e de por vezes o animal voltar ao início do *trial* sem que este tenha terminado. Este tipo de situações imprevisíveis tornam os *trials* de difícil segmentação. No entanto, depois dos *trials* serem devidamente segmentados (pelo utilizador). Pode-se efectuar uma nova segmentação é feita uma nova segmentação (desta vez automática) dentro deles para

identificar a posição do animal em cada segundo do *trial*. Depois separam-se os dados para calcular as coerências e os espectros ao longo do mesmo.

A segmentação automática no *T-maze* é implementada através de uma função que calcula as coerências em janelas de 240 pontos (200 milissegundos). Foi implementada uma função que em cada *trial* de teste calcula a coerência e a potência. Também nesta função se pode seleccionar o cálculo com ou sem sobreposição de janelas (de 50%). Os valores calculados de coerência e do espectro de potência são então transformados numa escala de cores e desenhados (em forma de bolas) ao longo da trajectória do animal (deste que o animal abandona a caixa inicial até que chega ao local da recompensa).

A presente função de segmentação automática não efectua qualquer tipo de média entre grupos, ou seja, apenas traga um gráfico de coerências (em escala de cores) ao longo de uma trajectória em cada *trial*. O gráfico final é então a sobreposição de todos os *trials* seleccionados pelo utilizador.

3.4 Análise Neuronal

Depois de os dados neuronais serem devidamente segmentados (de forma manual ou automática) procede-se à análise neuronal destes segmentos. A análise neuronal comporta o cálculo de espectro do sinal e coerências entre sinais provenientes das diferentes zonas do cérebro. Os métodos de cálculo das coerências e de espectros é apresentado na secção seguinte.

3.4.1 Cálculo do espectro de potências do sinal

A função de cálculo do espectro de potências entre as diferentes áreas do cérebro é uma das mais importantes do programa pois é o resultado desta que avalia as diferenças entre o grupo de teste e o grupo de controlo. Através desta função calcula-se uma estimativa do espectro do sinal de todas as áreas cerebrais cuja a actividade foi gravada.

Este cálculo realiza de acordo com a segmentação efectuada do sinal, isto é, em cada segmento de sinal seleccionado retiram-se janelas do sinal e calculam-se as coerências dentro desta janela. O resultado desta função é uma média do espectro de potências de todas as janelas pertencentes ao segmento em cada uma das diferentes regiões cerebrais (PFC, vHPC e dHPC tanto para o hemisfério esquerdo como para o

hemisfério direito) para todas as frequências analisadas (1-120 Hz). O tamanho destas janelas é também um parâmetro definido pelo utilizador. Para esta experiência escolheu-se utilizou-se um tamanho de janela de 1 segundo, significando que cada janela terá 1200 pontos. Outros dos parâmetros definidos pelo utilizador é a sobreposição (*overlap*) das janelas. Neste caso a função permite escolher somente entre nenhum *overlap* ou 50% de *overlap*.

A função do cálculo dos espectros utiliza uma função específica da biblioteca do *Chronux*. Esta função é a *mtspectrumc* que utiliza o método MTM para a aproximação do espectro de potencia do sinal [2]. Os *tapers* utilizados neste calculo foram de $[k,p] = [5, 9]$. Esta função calcula do espectro o sinal para as diferentes regiões do cérebro ao longo de todas as frequências analisadas (1-120 Hz). Nessa nova função os dados entram na forma de uma matriz com tantas colunas como regiões do cérebro (neste caso serão 6 colunas) e tantas linhas como amostras recolhidas ao longo da gravação. Para que a função seja executada correctamente deve-se indicar como parâmetro de entrada (os parâmetros de entrada são indicados pelo utilizador através de uma interface gráfica) o tamanho da janela a utilizar (neste caso será de 1200). É necessário também indicar se se pretende ou não sobreposição das janelas

3.4.2 Cálculo de coerências entre regiões cerebrais

Para o calculo das coerências também se extraíram janelas do sinal. O método de extracção das janelas é idêntico ao utilizado no caso do calculo dos espectros de potencia. Assim, em cada janela de sinal, calcula-se o espectro nas diferentes regiões do cérebro, para além disso também se calculam as coerências entre todas as combinações de áreas cerebrais gravadas. O método de cálculo é equivalente ao utilizado para o espectro, ou seja, o sinal divide-se em janelas e é aplica-se uma função que calcula a coerência da respectiva janela. No final, o resultado da função é uma média das coerências de todas as janelas pertencentes ao segmento em cada combinação de diferentes regiões cerebrais (PFC–vHPC, PFC–dHPC e dHPC–vHPC tanto para o hemisfério esquerdo como para o hemisfério direito) para todas as frequências analisadas (1-120 Hz). Tal como acontecia no caso do espectro também aqui vai ser aplicada a função *coerency*, (incluída na biblioteca do *Chronux* [2]).

Na saída, esta função retorna uma matriz com o número de colunas igual ao total de combinações entre as diferentes áreas do cérebro (neste caso tem-se 6 pois está-se a analisar a coerência entre PFC–dHPC, PFC–vHPC e vHPC–dHPC, para ambos os

hemisférios esquerdo e direito do cérebros) e com número de linhas igual as frequências analisadas (1- 120 Hz).

3.5 Estatística

Realizou-se o teste estatístico para verificar que as diferenças observadas entre o grupo de teste e o grupo de controlo são significativas, isto é, que não acontecem devido a causas aleatórias. O teste de confirmação estatística dos resultados é o *student t-test* para amostras independentes e de igual variância. Para tal, utilizou-se uma função da biblioteca do *Matlab* (a função, *ttest2*), a qual recebe como parâmetro de entrada as duas amostras e retorna como parâmetros de saída o resultado do teste (h , que é um valor na gama de 0–1) e ainda o p -value [64]. O teste é feito contra a hipótese nula que a média dos dois grupos ser igual, não existindo por isso nenhuma diferença estatística entre eles foi utilizando o nível de significância de 5% ($\alpha=0.05$). Assim, se h for igual a 1 significa que a hipótese nula é incorrecta (e existe uma diferença entre os dois grupos) e se h for igual a 0 significa que a hipótese nula é correcta (e não existe nenhuma diferença entre os dois grupos). A função retorna também o p -value, este parâmetro é o mais importante porque permite inferir se as diferenças observadas entre os grupos são significativas ou não. Se o p -value for superior a 0.05 (nível de significância) a diferença observada não é estatisticamente significativa. Senão, se for inferior a 0.05 é significativa; e for inferior a 0.01 é muito significativa. Sendo assim, as médias dos dois grupos em cada banda de frequências foram testadas e as diferenças estatisticamente significativas foram marcadas com um asterisco (*). Assim, nos gráficos de barras encontram-se estes asteriscos a marcar as barras cujas diferenças são significativas.

3.6 Interface com o Utilizador

A interface com o utilizador foi desenvolvida utilizando o *toolbox* GUIDE do *Matlab*. Na Figura 13 encontra-se representado um *screenshot* da interface desenhada onde se podem visualizar as opções disponíveis.

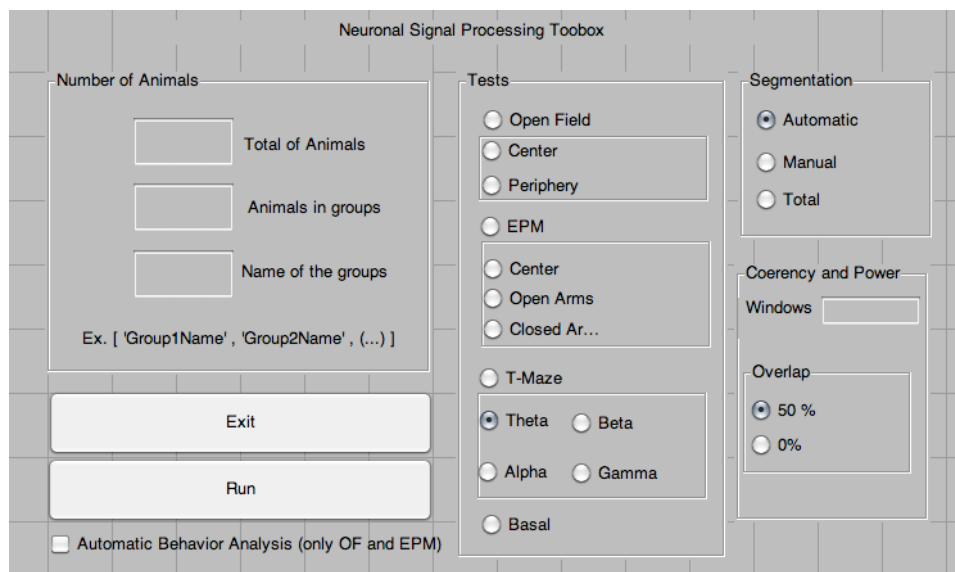


Figura 13: Representação de um *screenshot* da GUI desenvolvida.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

Os resultados da análise neuronal e de comportamento obtiveram-se a partir da dos métodos e algoritmos explicados no capítulo 3. Os sinais neuronais (LFPs) foram obtidos através do protocolo de gravações descrito no Anexo 2 em ratos machos adultos cronicamente implantados e em movimento livre. Foram utilizados dois grupos diferentes: o grupo de controlo (composto por 3 animais) e o grupo de teste (composto por 4 animais). Nos ratos pertencentes ao grupo de teste foi aplicado um protocolo de stress crónico (CUS) o qual é igualmente explicado convenientemente no Anexo.

Os resultados obtidos a partir da aplicação da função de cálculo de coerência, após referenciação dos sinais ao PFC direito, com uma janela de 1200 pontos (1 segundo) e sem sobreposição (*overlap*).

Os resultados obtidos podem ser representados com auxilio de diversos gráficos. Existem gráficos para os espectros de potência dos sinais e para as coerências. Nos gráficos dos espectros de potência representa-se a potência ao longo das frequências (numa escala logarítmica) com as respectivas barras de erro. Neste gráfico o eixo dos *xx* representa frequências enquanto que o eixo do *yy* representa a potência média. Existe um gráfico semelhante para as coerências. Em ambos os gráficos se representa a média de cada grupo com os respectivos erros médios.

Um outro do gráfico possível separa em diferentes barras as diferentes bandas de frequência do sinal, isto é, banda Delta (0,5–4 Hz), Teta (4–8 Hz), Alfa (8–12 Hz), Beta (12–30) e Gama (>30 Hz). Este tipo de gráfico existe para o caso das coerências e também para o caso das potências. Existe um gráfico de barras para cada banda de frequências. Em cada um destes gráfico encontram-se as barras correspondentes a cada região cerebral para cada grupo de animais. Mais uma vez é calculada a média para cada grupo de animais assim como o respectivo erro médio.

Outro dos gráficos possível é o que codifica a coerência (0–1) em código de cores (*coherogram*). Para este gráfico é necessário construir uma matriz com tantas linhas como animais testados representando em cada linha as coerências em todas as frequências (colunas representam frequências). É necessário em seguida codificar cada coerência em cor. Neste gráfico é fácil identificar facilmente diferenças de coerência entre os dois grupos de uma forma mais intuitiva e também é mais fácil identificar em que banda de frequências estas diferenças aparecem. Uma utilização muito importante deste gráfico é a identificação de *outliers* (aberrações), ou seja, animais com valores de coerência muito dispares da média do seu grupo. Este é o único gráfico onde tal se pode fazer uma vez que nenhum dos outros apresenta as coerências de um determinado animal mas apenas a média de cada grupo.

Tal como previamente mencionado, o cálculo das coerências e potências (apresentados sobre o formato dos gráficos acima referidos) faz-se em segmentos do sinal, extraídos manual ou automaticamente. Os gráficos seguintes representam o resultado do cálculo de coerências e potências para os segmentos do sinal (manuais ou automáticos) segundo os algoritmos implementados. Para além dos resultados da análise neuronal apresentam-se também os resultados de cada uma das segmentações automáticas implementadas.

Na secção 4.1 apresentam-se os resultados obtidos com um algoritmo de segmentação automática baseado em deslocamento e velocidade e os resultados da análise neuronal das gravações efectuadas nos primeiros dias do protocolo de stress (primeiros e restantes dias porque os diferentes grupos foram gravados em diferentes dias consecutivos) e nos últimos dias do protocolo de stress (utilizando para tal os segmentos seleccionados de forma manual). Na secção 4.2 apresentam-se os resultados da segmentação automática implementada no OF, a análise de comportamento automática e a análise neuronal dos segmentos extraídos de forma automática segundo a posição no teste. A organização da secção 4.3. é semelhante, mas com a diferença de representar os resultados obtidos para o EPM. A secção 4.4 refere-se aos resultados do TM.

4.1 Actividade Basal

4.1.1 Resultados obtidos com a implementação do algoritmo de Segmentação Automática

A aplicação do algoritmo de segmentação automática identifica os segmentos através de um gráfico de deslocamento ao longo do tempo e através da velocidade média calculada em janelas de 50 pontos (o que corresponde a 2,5 segundos).

Para efeitos de determinação da precisão do algoritmo na extracção dos referidos segmentos comparou-se a percentagem de tempo seleccionado pelo algoritmo com a percentagem de tempo seleccionado manualmente.

Para esta análise foram considerados como correctos os segundo pertencentes aos segmentos previamente seleccionados de forma manual. Estes segmentos foram comparados com os obtidos no algoritmo de segmentação automática. Na tabela 1 encontram-se representados os resultados do algoritmo em termos de percentagens médias de segmentos correctamente seleccionados (segmentos que se são seleccionados manual e automaticamente), segmentos incorrectamente seleccionados (segmentos que não se encontram presentes na segmentação manual mas que se encontram na segmentação automática) e por fim, certos não seleccionados (segmentos seleccionados manualmente e que não são seleccionados pelo algoritmo). Foram analisadas as percentagens para três *thresholds* de velocidade diferentes, 50, 55 e 60.

Tabela 1. Tabela de resultados obtidos com o algoritmo de segmentação automática para três valores de *threshold* de velocidade diferentes.

	% média certos seleccionados	% média errados seleccionados	% média certos não seleccionados
Th=50	52,5	47,5	40,25
Th=55	53,5	46,25	40,75
Th=60	58,75	41,25	53,25

4.1.2 Análise Neuronal a partir de segmentação manual

Seguidamente representam-se os resultados da análise neuronal dos LFPs provenientes das gravações da actividade basal durante o período da manhã. Os gráficos

seguintes foram obtidos por segmentação manual dos sinais neuronais. Nesta secção encontram-se representados os diversos *outputs* conseguidos através da plataforma desenvolvida para a análise de LFPs. De forma a poder-se avaliar os efeitos do stress nos animais ao longo do protocolo, foram calcularam-se os gráficos de potência e de coerência para os primeiros dias de gravações e para os últimos dias de gravações. Os resultados obtidos estão representados nesta secção.

Em relação aos espectros de potência (representados nas Figuras 14, 15, 16 e 17) existe uma tendência para a potência dos sinais gravados nos animais stressados ser maior do que nos animais de controlo. Nos primeiros dias existem poucos resultados significativos (o que indica que as medias de ambos os grupos são iguais) mas estes passam a ser significativos nos últimos dias e mostram que a média do grupo de animais stressados é maior do que a dos animais de controlo.

Nas Figuras 18, 19, 20 e 21 encontram-se representados os gráficos para a média das coerências para todas as frequências em análise dos dois grupos de animais. As Figuras 18 e 20 correspondem aos primeiros dias de gravações e as Figuras 19 e 21 aos últimos dias de gravação. Nas gravações efectuadas nos últimos dias do protocolo de stress parece que a média do grupo dos animais stressados sobe em relação ao grupo de controlo, pode-se ver isso nas coerências calculadas entre dHPC e PFC para ambos os hemisférios cerebrais. Parece também existir uma ligeira subida da média dos animais stressados em relação aos controlos na banda de frequência gama (Figuras 19 e 21) entre o dHPC e vHPC que não acontece para as restantes bandas de frequência.

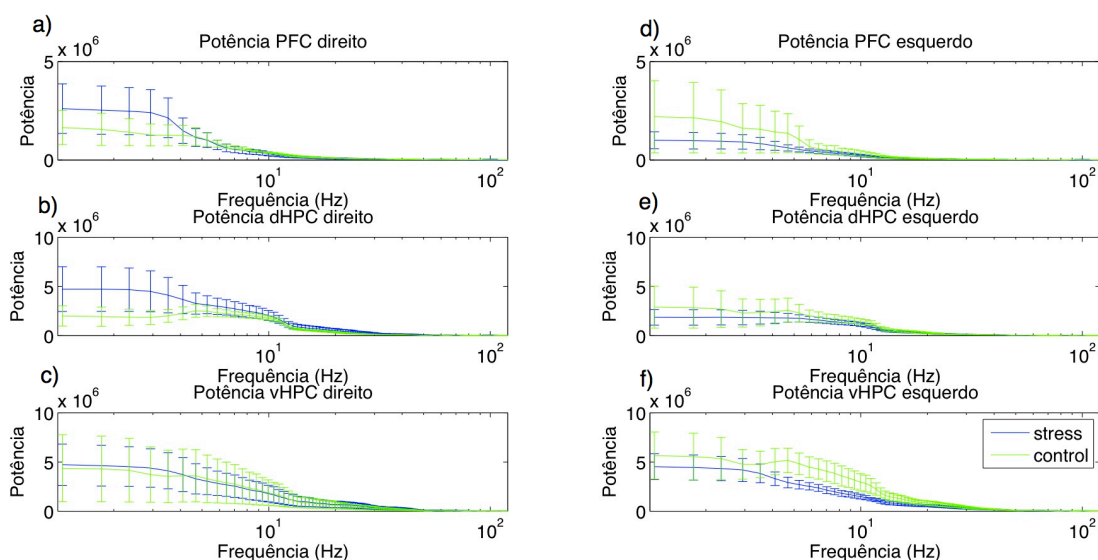


Figura 14: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo do espectro de potência nos segmentos da actividade basal dos primeiros dias de gravação seleccionados manualmente nas regiões: a) PFC

direito, b) dHPC direito, c) vHPC direito, d) PFC esquerdo, e) dHPC e f) vHPC esquerdo, em que a linha azul representa a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e a linha verde representa a média do grupo de controlo (3 animais).

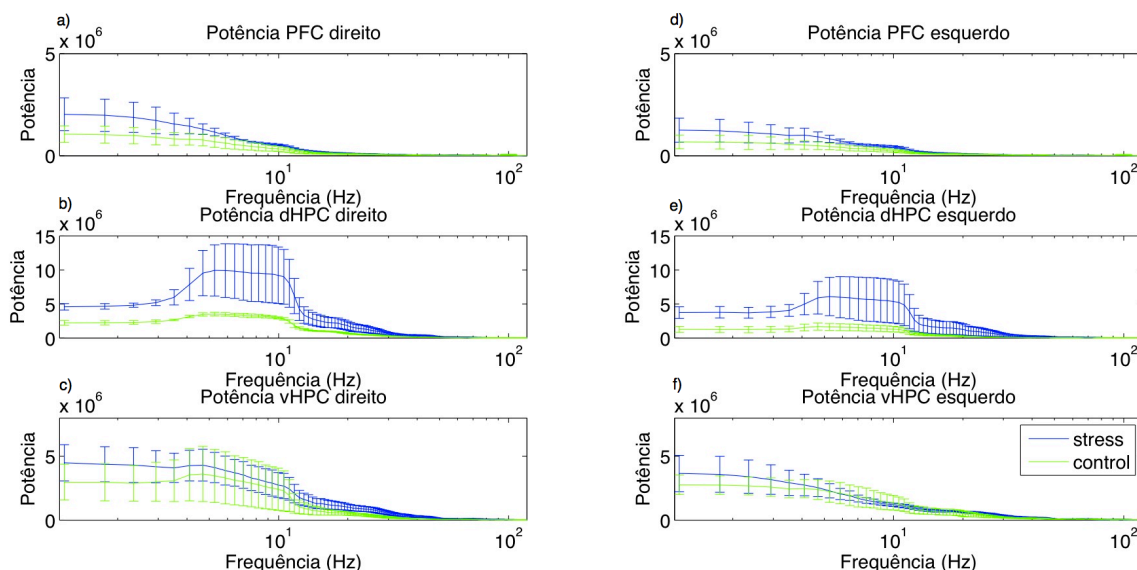


Figura 15: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo do espectro de potência nos segmentos da actividade basal dos últimos dias de gravação seleccionados manualmente nas regiões: a) PFC direito, b) dHPC direito, c) vHPC direito, d) PFC esquerdo, e) dHPC e f) vHPC esquerdo, em que a linha azul representa a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e a linha verde representa a média do grupo de controlo (3 animais).

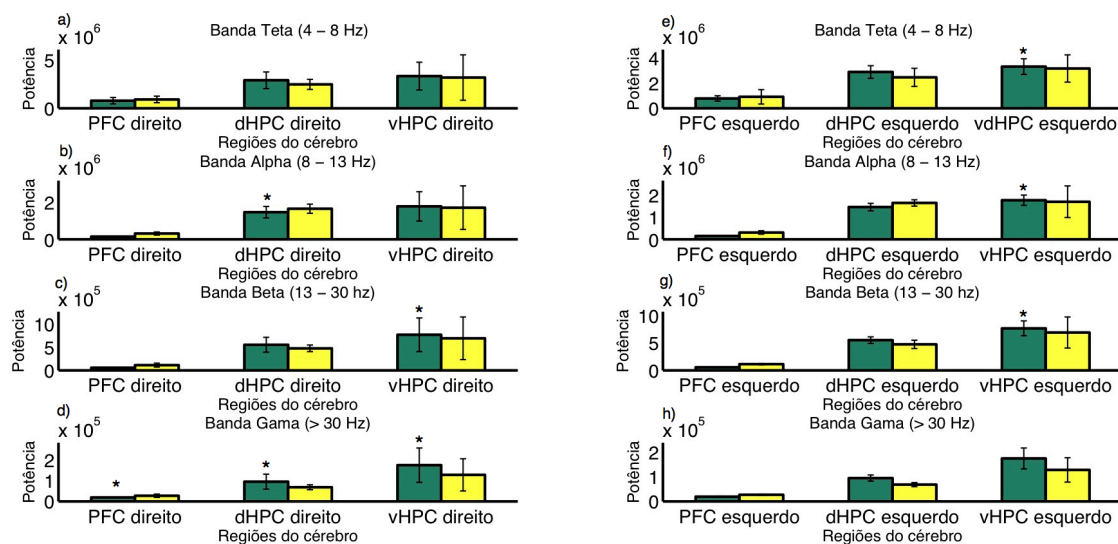


Figura 16: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo dos espectros de potência para todas as regiões cerebrais nos segmentos da actividade basal dos primeiros dias de gravação seleccionados manualmente nas bandas de frequência: a e e) Teta (4 – 8 Hz), b e f) Alfa (9 – 13 Hz), c e g) Beta (13 – 30 Hz) e d e h) Gama (>30 Hz) para os hemisférios direito e esquerdo do cérebro em que as barras verdes representam a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e as barras amarelas representam a média do grupo de controlo (3 animais).

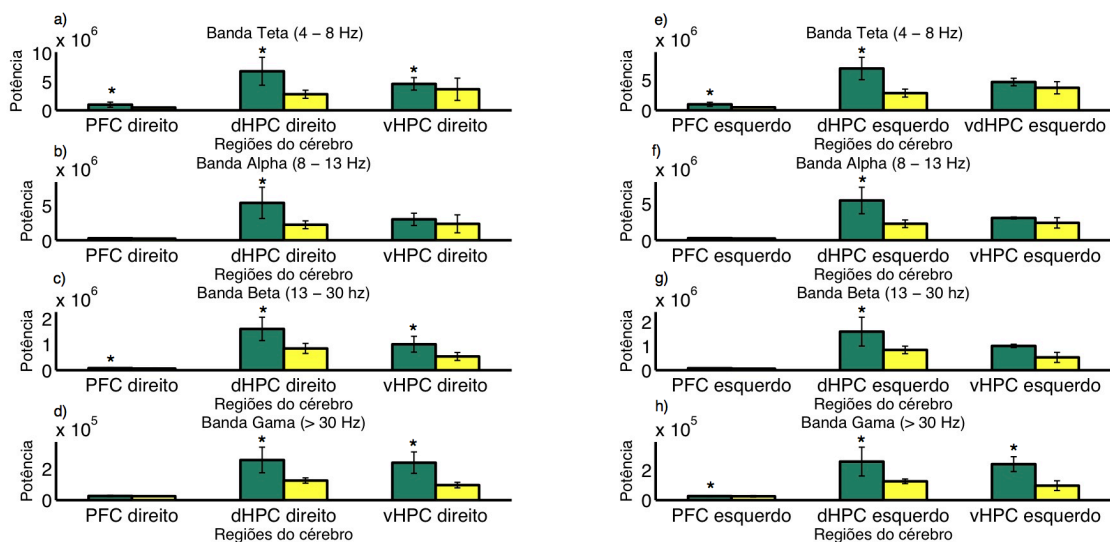


Figura 17: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo dos espectros de potência para todas as regiões cerebrais nos segmentos da actividade basal dos últimos dias de gravação seleccionados manualmente nas bandas de frequência: a e e) Teta (4 – 8 Hz), b e f) Alfa (9 – 13 Hz), c e g) Beta (13 – 30 Hz) e d e h) Gama (>30 Hz) para os hemisférios direito do cérebro e esquerdo do cérebro em que as barras verdes representam a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e as barras amarelas representam a média do grupo de controlo (3 animais).

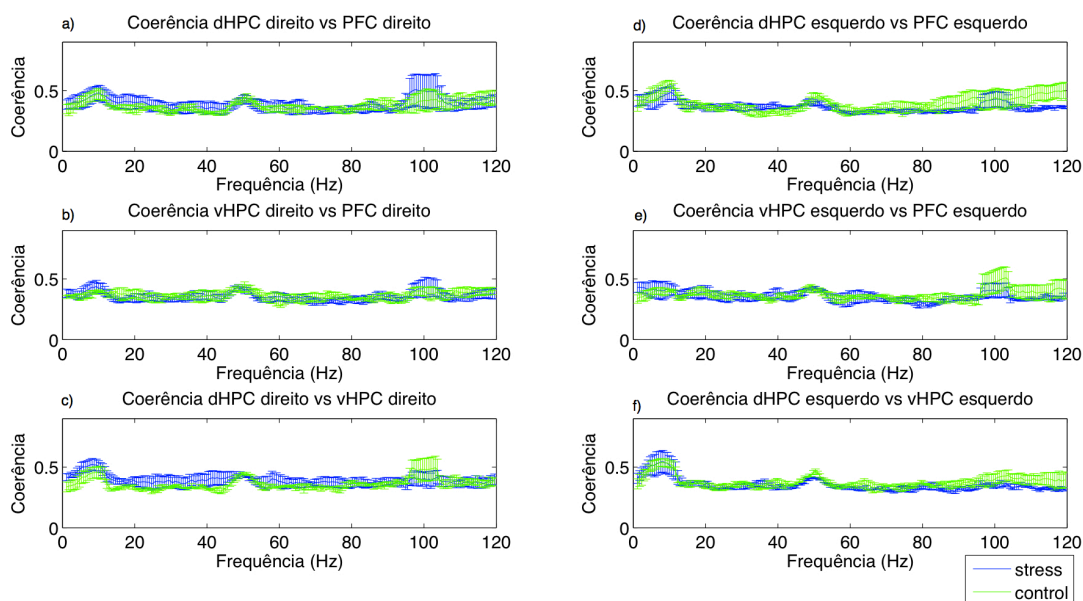


Figura 18: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo da coerência nos segmentos da actividade basal dos primeiros dias de gravação retirados manualmente entre: a) dHPC direito – PFC direito, b) vHPC direito – PFC direito, c) dHPC direito – vHPC direito, d) dHPC esquerdo – PFC esquerdo, e) vHPC esquerdo – PFC esquerdo e f) dHPC esquerdo – vHPC esquerdo, em que a linha azul representa a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e a linha verde representa a média do grupo de controlo (3 animais).

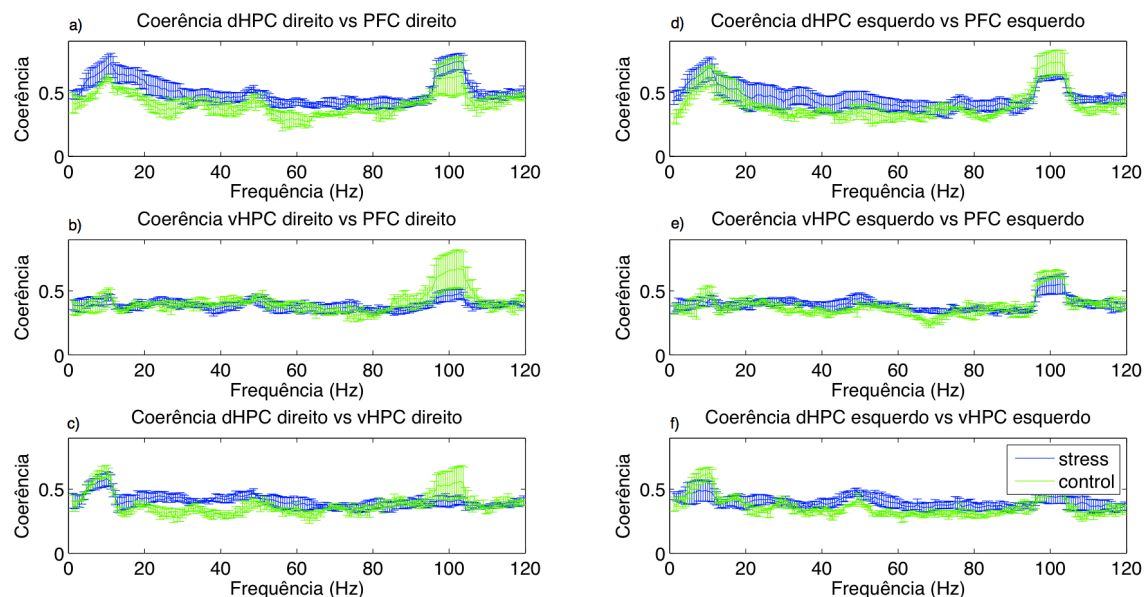


Figura 19: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo da coerência nos segmentos da actividade basal dos últimos dias de gravação retirados manualmente entre: a) dHPC direito – PFC direito, b) vHPC direito – PFC direito, c) dHPC direito – vHPC direito, d) dHPC esquerdo – PFC esquerdo, e) vHPC esquerdo – PFC esquerdo e f) dHPC esquerdo – vHPC esquerdo, em que a linha azul representa a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e a linha verde representa a média do grupo de controlo (3 animais).

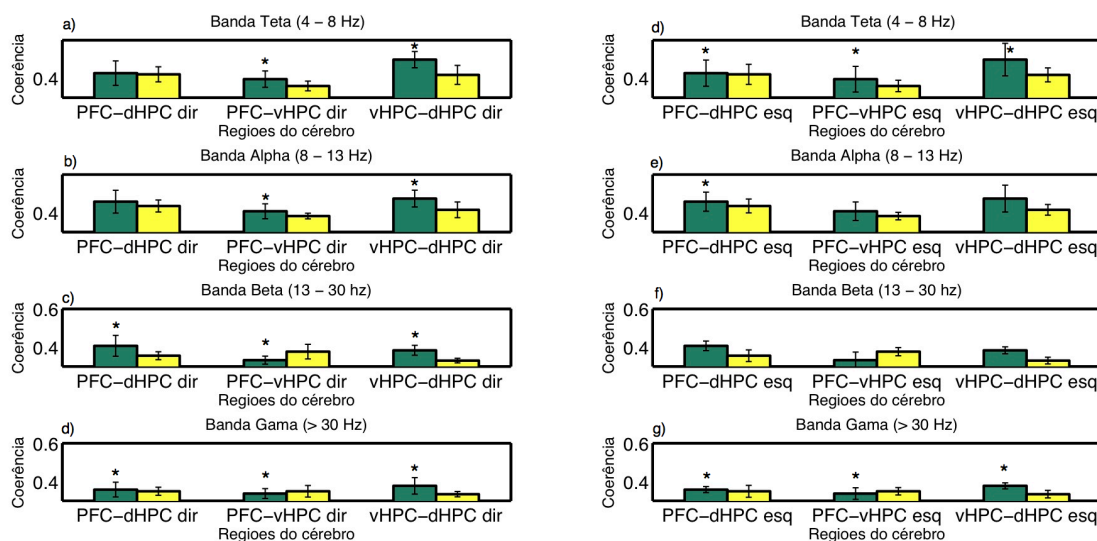


Figura 20: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo das coerências para todas as combinações de regiões cerebrais nos segmentos da actividade basal dos primeiros dias de gravação seleccionados manualmente nas bandas de frequência: a e e) Teta (4 – 8 Hz), b e f) Alfa (9 – 13 Hz), c e g) Beta (13 – 30 Hz) e d e h) Gama (>30 Hz) para os hemisférios direito do cérebro e esquerdo do cérebro em que as barras verdes representam a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e as barras amarelas representam a média do grupo de controlo (3 animais).

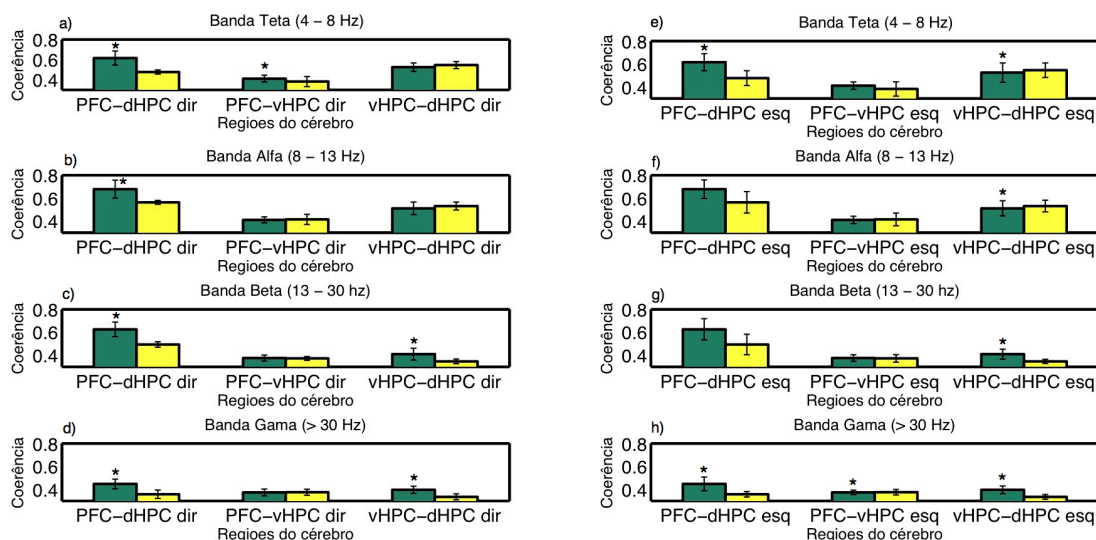


Figura 21: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo das coerências para todas as combinações de regiões cerebrais nos segmentos da actividade basal dos últimos dias de gravação seleccionados manualmente nas bandas de frequência: a e e) Teta (4 – 8 Hz), b e f) Alfa (9 – 13 Hz), c e g) Beta (13 – 30 Hz) e d e h) Gama (>30 Hz) para os hemisférios direito do cérebro e esquerdo do cérebro em que as barras verdes representam a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e as barras amarelas representam a média do grupo de controlo (3 animais).

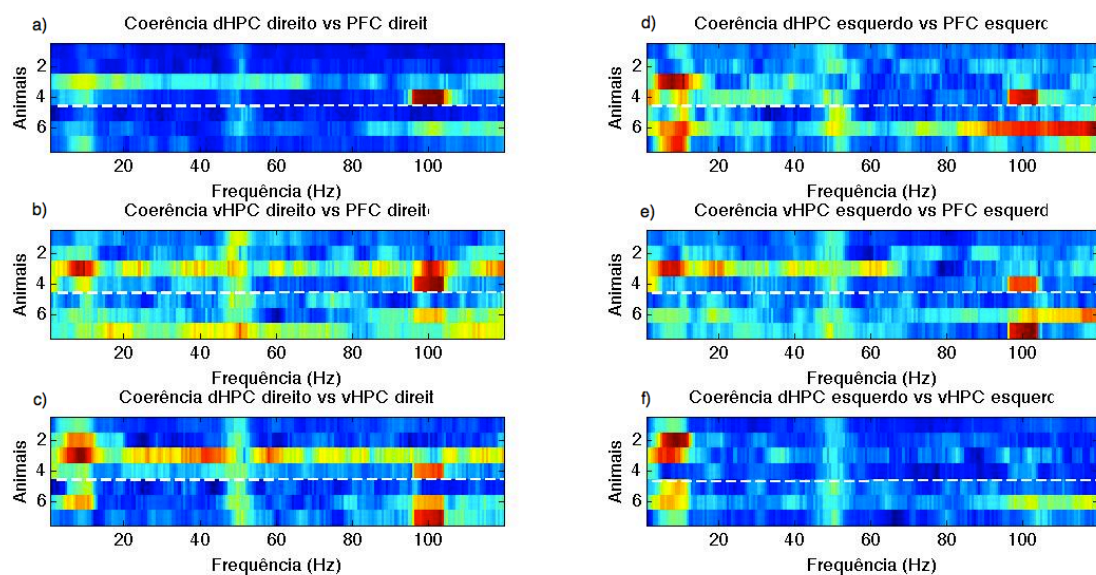


Figura 22: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo da coerência (representada em código de cores) nos segmentos da actividade basal dos primeiros dias de gravação seleccionados manualmente para cada animal (as 4 primeiras linhas referem-se ao grupo de animais stressados e as ultimas 3 ao grupo de animais de controlo) entre: a) dHPC direito – PFC direito, b) vHPC direito – PFC direito, c) dHPC direito – vHPC direito, d) dHPC esquerdo – PFC esquerdo, e) vHPC esquerdo – PFC esquerdo e f) dHPC esquerdo – vHPC esquerdo.

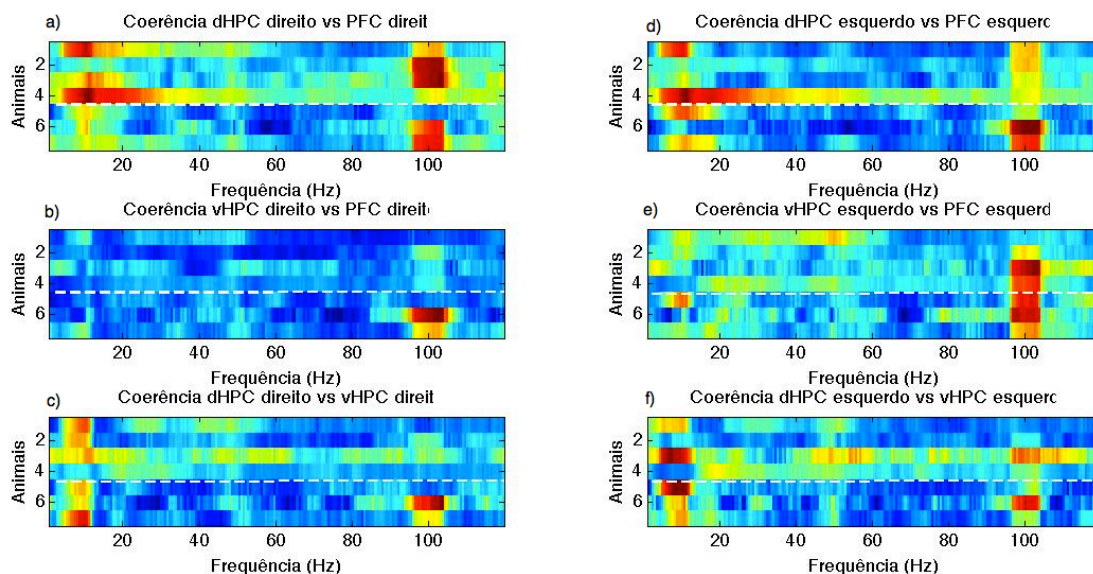


Figura 23: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo da coerência (representada em código de cores) nos segmentos da actividade basal dos últimos dias de gravação seleccionados manualmente para cada animal (as 4 primeiras linhas referem-se ao grupo de animais stressados e as ultimas 3 ao grupo de animais de controlo) entre: a) dHPC direito – PFC direito, b) vHPC direito – PFC direito, c) dHPC direito – vHPC direito, d) dHPC esquerdo – PFC esquerdo, e) vHPC esquerdo – PFC esquerdo e f) dHPC esquerdo – vHPC esquerdo.

4.2 Open Field

Seguidamente encontram-se representados os resultados obtidos para o OF. Na secção 4.2.1 representam-se os resultados obtidos através da aplicação do algoritmo de segmentação automática para a análise de comportamento. Na secção 4.2.2. representam-se os resultados electrofisiológicos obtidos através do cálculo das coerências e espectros de potência aos segmentos obtidos automaticamente (neste capítulo apenas se encontra representada a análise aos segmentos do centro, a análise aos segmentos da periferia, por não apresentar diferenças, encontra-se no Anexo 3).

4.2.1 Análise automática de comportamento

A figura 24 representa as posições do *tracking* de dois animais (um de cada grupo, controlo e stress) de acordo com a segmentação efectuada no OF para cada região do teste. Assim, na Figura 24a encontram-se as posições do animal do grupo de teste enquanto na Figura 24b encontram-se representadas as posições do animal do grupo de controlo. Tal como se pode verificar, o animal do grupo de controlo apresentou mais pontos (que correspondem a coordenadas x e y) no centro do que o animal do grupo de stress. Este é um comportamento esperado.

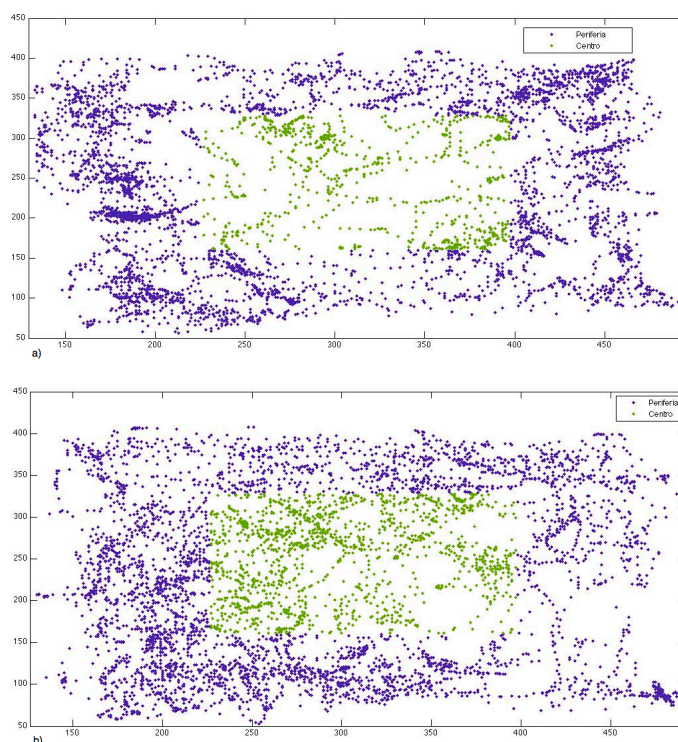


Figura 24: Representação dos pontos do *tracking* em cada uma das regiões do OF de acordo com o algoritmo de segmentação automática implementada para a) um animal pertencente ao grupo dos stressados (77% dos pontos pertencem à periferia e 23% ao centro) e b) um animal pertencente ao grupo de controlo (62% dos pontos pertencem à periferia e 38% ao centro) .

Os resultados da análise de comportamento com recurso aos algoritmos aplicados aos dois grupos de ratos testados encontram-se representados no gráfico da Figura 25. Os gráficos das Figuras 25 a e c são percentagens enquanto os gráficos das Figuras 25 b e 25d representam a média da totalidade de tempo e cruzamentos contados em cada área com as respectivas barras de erro (erro médio).

Relativamente aos dados de comportamento para a média entre os animais de controlo e os animais de stress, é possível observar que não existem diferenças comportamentais entre os grupos. Em relação ao tempo passado nas diferentes regiões (Figura 25a) do teste ambos os grupos apresentam mais tempo passado na periferia, o que seria de esperar. Em relação aos cruzamentos (Figura 25c), as médias dos grupos indicam um aumento do número de cruzamentos para no centro no grupo dos controlos, o que também seria espectável. Como se pode observar nas Figuras 25 b e 25d as diferenças entre os grupos não são significativas (caso fosse existiriam um asterisco por cima das barras correspondentes).

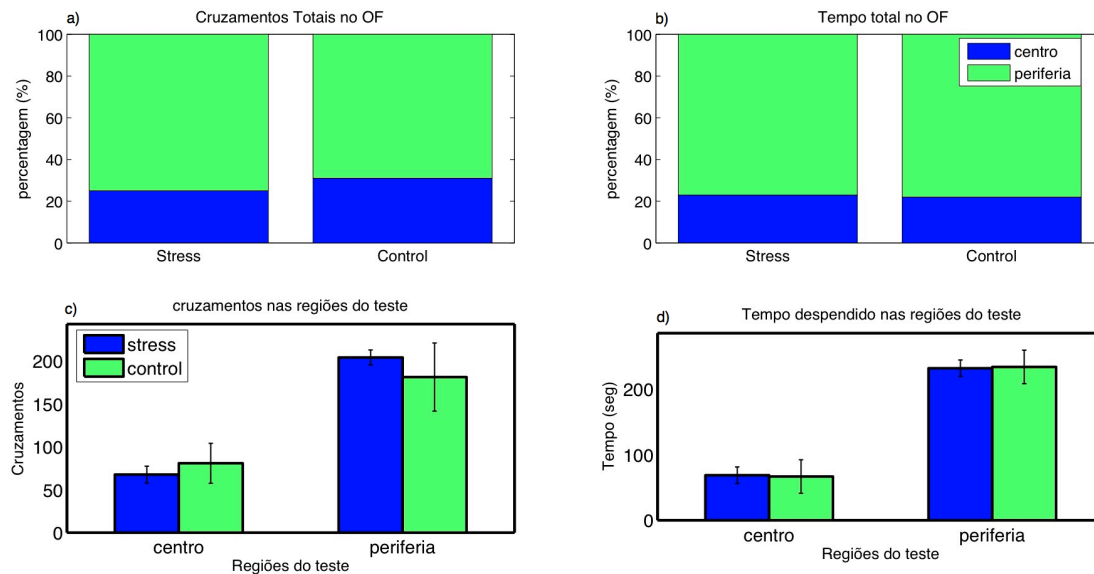


Figura 25: a) Representação gráfica da totalidade dos cruzamentos no OF onde se encontram as percentagens referente ao centro (azul) e periferia (verde) para o grupo de animais sujeitos a CUS (stress) e o grupo de controlo. c) Representação gráfica da totalidade do tempo no OF onde se encontram as percentagens referente ao centro (azul) e periferia (vermelho) para o grupo de animais sujeitos a CUS (stress) e o grupo de controlo. b) Número médio de cruzamentos no centro e periferia para o grupo de controlo (verde) e para o grupo de stress (azul) e d) tempo médio despendido em cada uma das áreas do teste para o grupo de controlo (verde) e para o grupo de stress (azul).

4.2.2 Análise Neuronal a partir de segmentação Automática (segmentos do centro)

Em relação aos gráficos de espectros de potência para os segmentos do centro do EPM (Figuras 26 e 27) pode-se observar que as médias do grupo de animais stressados estão acima dos animais de controlo. Dos gráficos em que as médias são separadas por bandas observa-se que a grande maioria das diferenças são significativas à luz do teste estatístico utilizado. Tal como também acontecia para o caso dos últimos dias do protocolo de stress, também aqui se observa um aumento de potência no HPC dorsal em relação às restantes áreas.

As coerências nos segmentos do centro estão representadas nas Figuras 28, 29 e 30. A nível das coerências é possível observar uma ligeira subida da média dos animais stressados relativamente aos animais de controlo. Tal como se pode verificar pela análise dos gráficos da Figura 29, esta diferença aparece sobretudo nas bandas teta e alfa para entre o dHPC e o PFC tanto no hemisfério direito como no hemisfério esquerdo do cérebro. Em relação ao gráfico da Figura 28 (em que se podem ver as coerências ao longo da frequência para cada animal) pode-se observar que no grupo dos animais stressados existe uma cor mais quente (o que indica maior coerência). Também se

observa isto nas bandas de frequência mais baixas para os animais stressados (que são as primeiras 4 linhas do gráfico).

Uma vez que os gráficos referentes aos segmentos da gravação no centro do OF não apresentavam diferenças relativamente aos segmentos da periferia, os gráficos referentes a estes últimos são remetidos para Anexo 3.

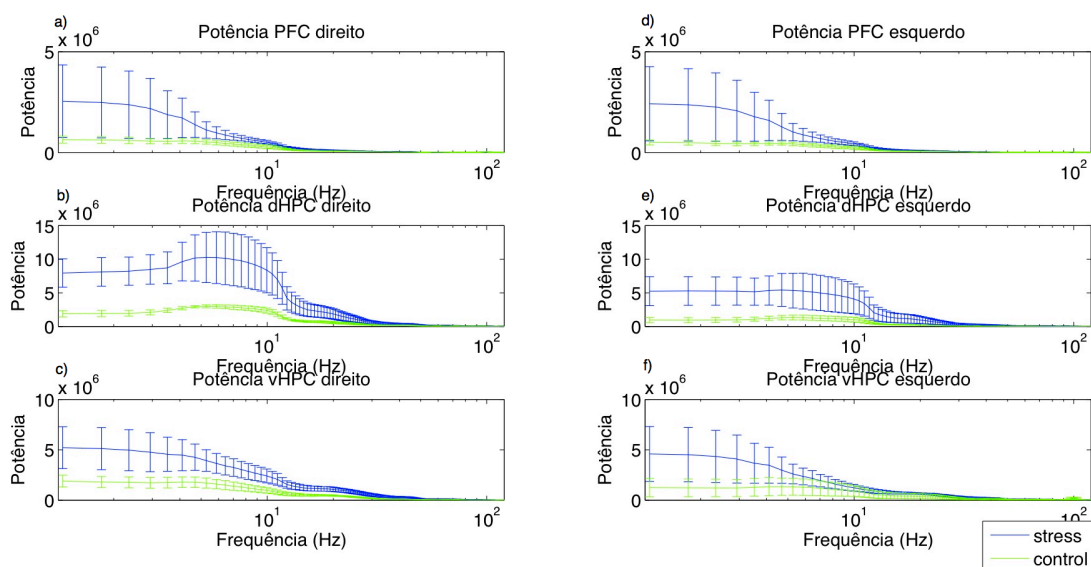


Figura 26: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo do espectro de potência nos segmentos do centro do OF seleccionados manualmente nas regiões: a) PFC direito, b) dHPC direito, c) vHPC direito, d) PFC esquerdo, e) dHPC e f) vHPC esquerdo, em que a linha azul representa a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e a linha verde representa a média do grupo de controlo (3 animais).

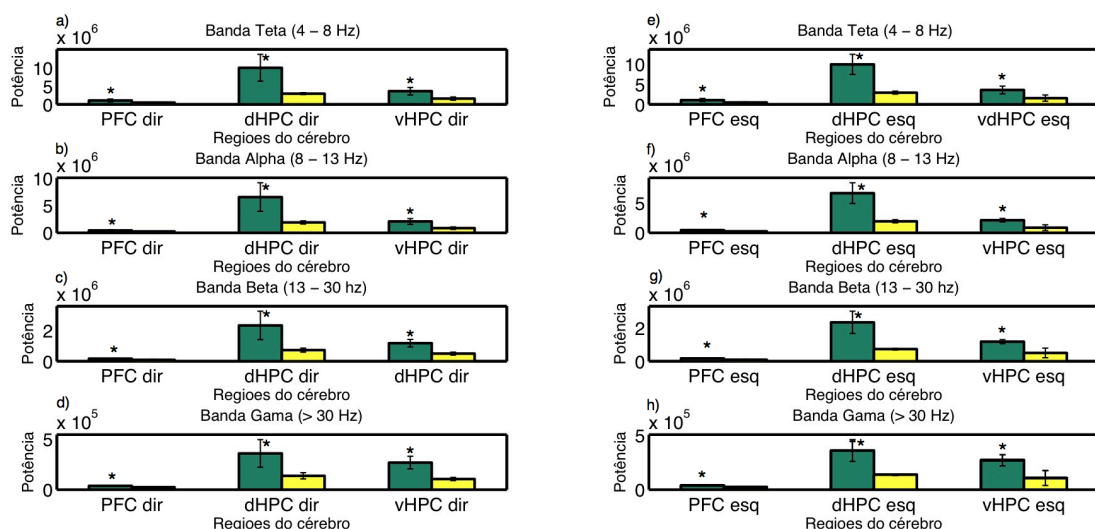


Figura 27: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo dos espectros de potência para todas as regiões cerebrais nos segmentos do centro do OF seleccionados automaticamente nas bandas de frequência: a e e) Teta (4 – 8 Hz), b e f) Alfa (9 – 13 Hz), c e g) Beta (13 – 30 Hz) e d e h) Gama (> 30 Hz) para os hemisférios direito do cérebro e esquerdo do cérebro em que as barras verdes representam a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e as barras amarelas representam a média do grupo de controlo (3 animais).

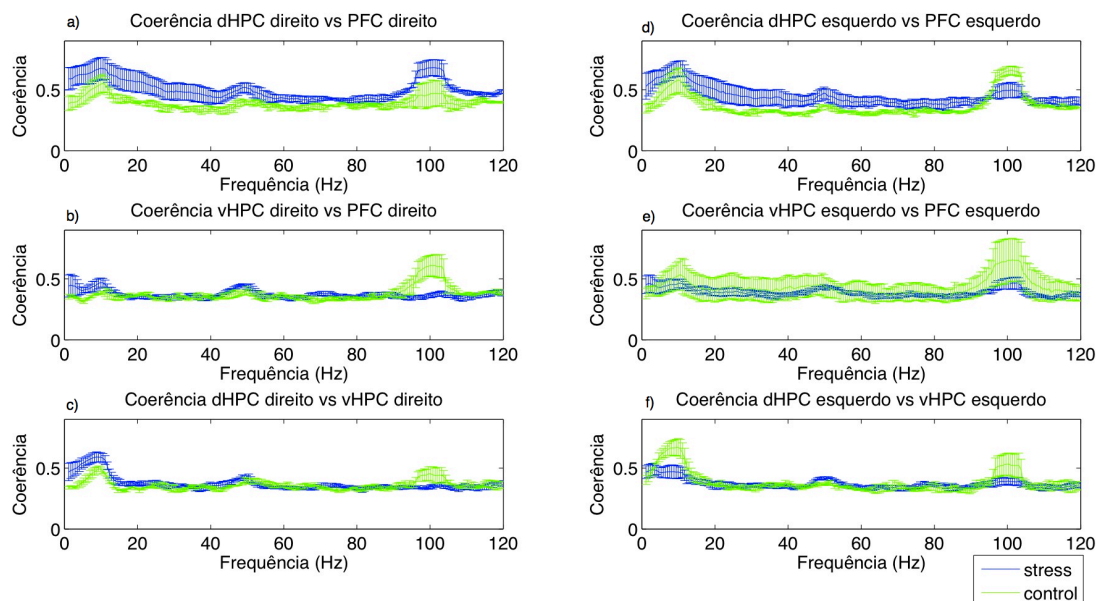


Figura 28: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo da coerência nos segmentos do centro do OF entre: a) dHPC direito – PFC direito, b) vHPC direito – PFC direito, c) dHPC direito – vHPC direito, d) dHPC esquerdo – PFC esquerdo, e) vHPC esquerdo – PFC esquerdo e f) dHPC esquerdo – vHPC esquerdo, em que a linha azul representa a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e a linha verde representa a média do grupo de controlo (3 animais).

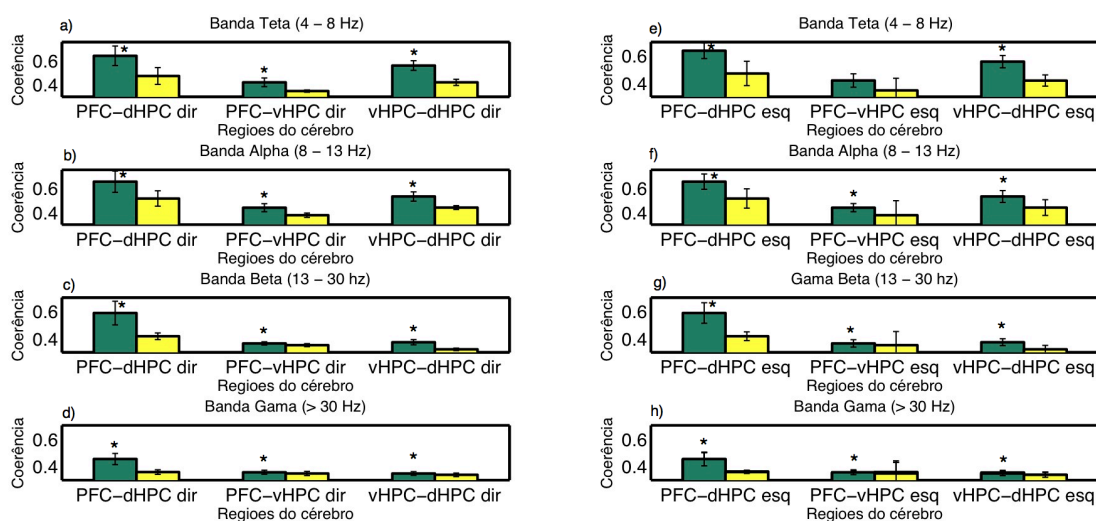


Figura 29: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo das coerências para todas as combinações de regiões cerebrais nos segmentos da actividade no centro do OF obtidos de forma automática dos últimos dias de gravação seleccionados manualmente nas bandas de frequência: a e e) Teta (4 – 8 Hz), b e f) Alfa (9 – 13 Hz), c e g) Beta (13 – 30 Hz) e d e h) Gama (>30 Hz) para os hemisférios direito do cérebro e esquerdo do cérebro em que as barras verdes representam a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e as barras amarelas representam a média do grupo de controlo (3 animais).

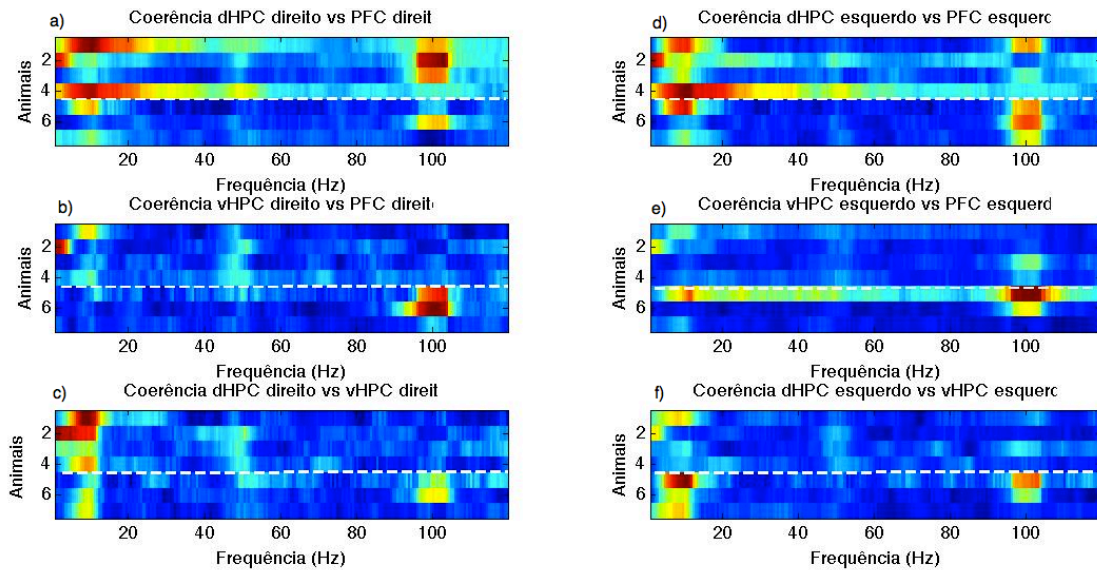


Figura 30: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo da coerência (representada em código de cores) nos segmentos do centro do OF para cada animal (as 4 primeiras linhas referem-se ao grupo de animais stressados e os ultimas 3 ao grupo de animais de controlo) entre: a) dHPC direito – PFC direito, b) vHPC direito – PFC direito, c) dHPC direito – vHPC direito, d) dHPC esquerdo – PFC esquerdo, e) vHPC esquerdo – PFC esquerdo e f) dHPC esquerdo – vHPC esquerdo.

4.3 EPM

Seguidamente, encontram-se representados os resultados obtidos para o EPM. A secção 4.2.1 representa os resultados com o algoritmo de segmentação automática para a análise de comportamento. A secção 4.2.2 representa os resultados electrofisiológicos a partir das coerências e dos espectros de potência aplicados sobre os segmentos obtidos automaticamente.

4.3.1 Análise automática de comportamento no EPM

A figura 31 representada as posições do *tracking* de dois animais (um de cada grupo, controlo e stress) de acordo com a segmentação automática efectuada no EPM para cada região do teste (centro, braços fechados e braços abertos). Assim na Figura 31a encontram-se as posições do animal do grupo de teste enquanto na Figura 31b encontram-se representadas as posições do animal do grupo de controlo.

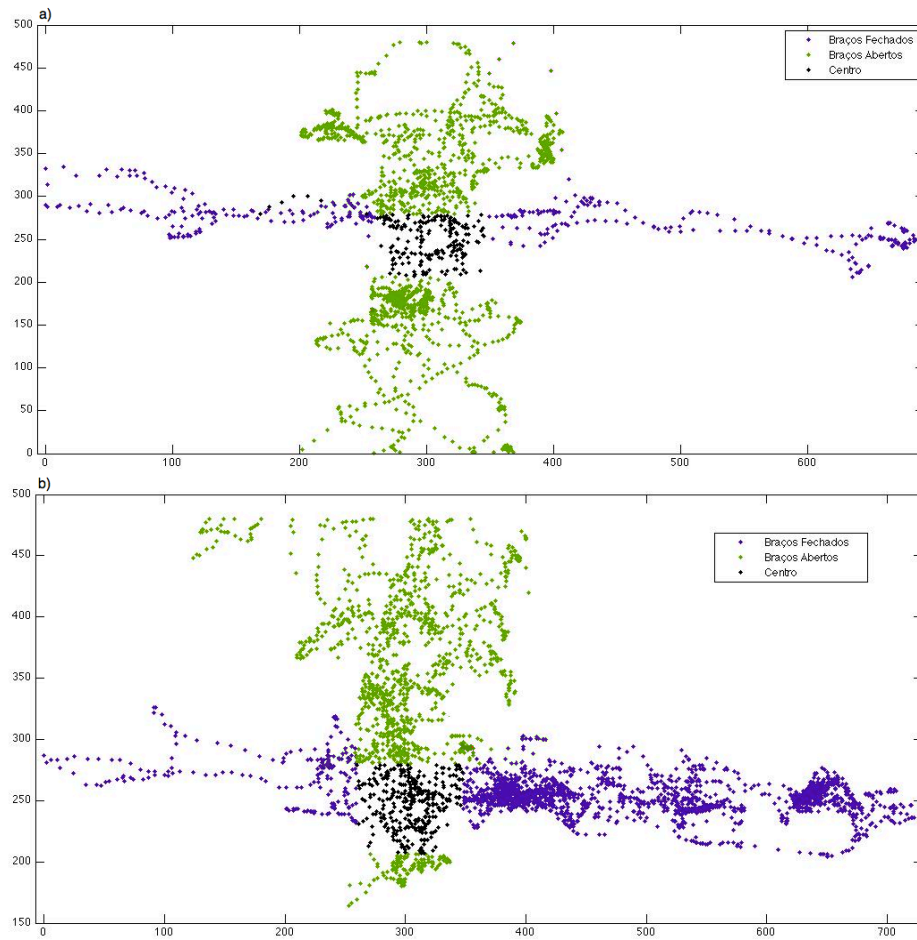


Figura 31: Representação dos pontos do *tracking* em cada uma das regiões do EPM de acordo com ao algoritmo de segmentação automática implementada para a) um animal pertencente ao grupo dos stressados (9% dos pontos pertencem ao centro, 18% aos braços fechados e 73% aos braços abertos) e b) um animal pertencente ao grupo de controlo (6% dos pontos pertencem ao centro, 55% aos braços fechados e 39% aos braços abertos).

A Figura 32 representa os resultados de comportamento obtidos com o EPM através dos algoritmos de segmentação automática. Os resultados obtidos para o número de entradas em cada área mostram que, contrariamente ao que seria de esperar, ambos os grupos apresentam mais entradas nos braços abertos do que do nos braços fechados. Analisando as diferenças entre os grupos para cada uma das áreas do teste (Figura 32c) pode-se observar que nenhuma das diferenças é estatisticamente significativa. Os resultados obtidos para o tempo passado em cada uma das áreas do testes mostram mais tempo passado nos braços abertos do que nos braços fechados (para ambos os grupos), o que seria de esperar. Os resultados mostram também que o grupo de stress passou mais tempo nos braços fechados do que o de controlo. A situação contrária acontece nos braços abertos; todavia, estas diferenças não são de novo estatisticamente significativas.

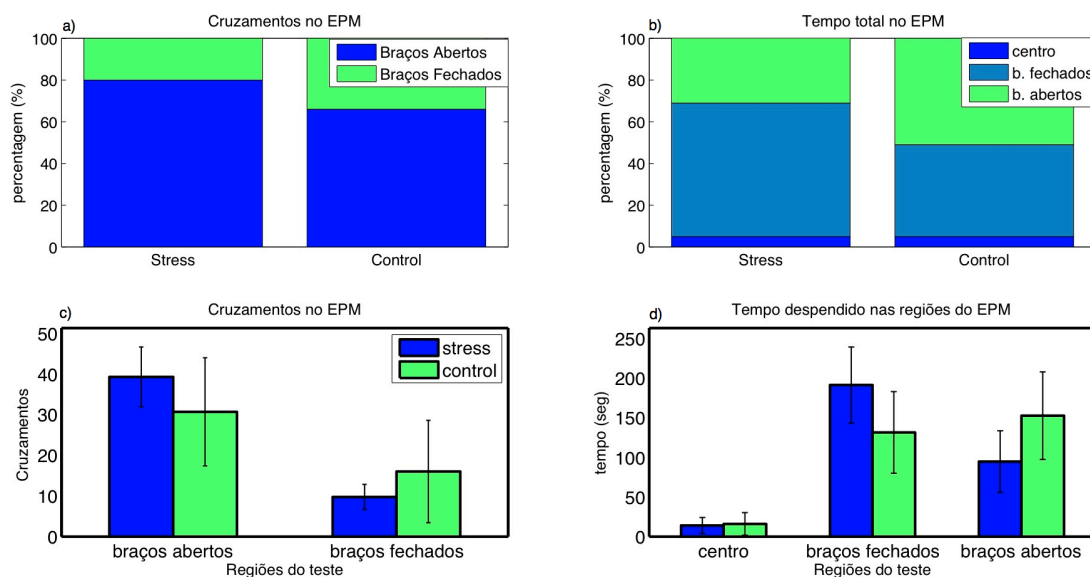


Figura 32: Representação gráfica dos dados de comportamento obtidos de forma automática a) percentagem de cruzamentos para cada região c) percentagem de tempo total despendido em cada região do teste b) número de cruzamentos médio em cada região para cada grupo (com as barras de erro médio) d) tempo médio despendido em cada área para cada uma das regiões do teste (com as respectivas barras de erro médio).

4.3.2 Análise Neuronal a partir de segmentação Automática (segmentos dos braços fechados)

Os gráficos referentes à análise neuronal para os dados gravados durante a realização do EPM e segmentados automaticamente, mostraram também uma ligeira subida da média dos coerências entre o dHPC e PFC (do hemisfério direito e esquerdo do cérebro) do grupo dos animais stressados em relação aos animais de controlo (Figura 35 e 36). Esta subida acontece para as bandas de frequência mais baixas como a teta e a alfa.

Em relação aos espectros de potência observam-se as tendências também obtidas para os casos dos últimos dias do protocolo de stress e OF. Ou seja, um aumento da potência do hipocampo dorsal para os animais de CUS em relação aos de controlo (Figuras 33 e 34). Estas diferenças acontecem nas 3 regiões do teste, ou seja, no centro, nos braços fechados e na periferia. Os gráficos obtidos para as restantes zonas encontram-se no anexo 3.

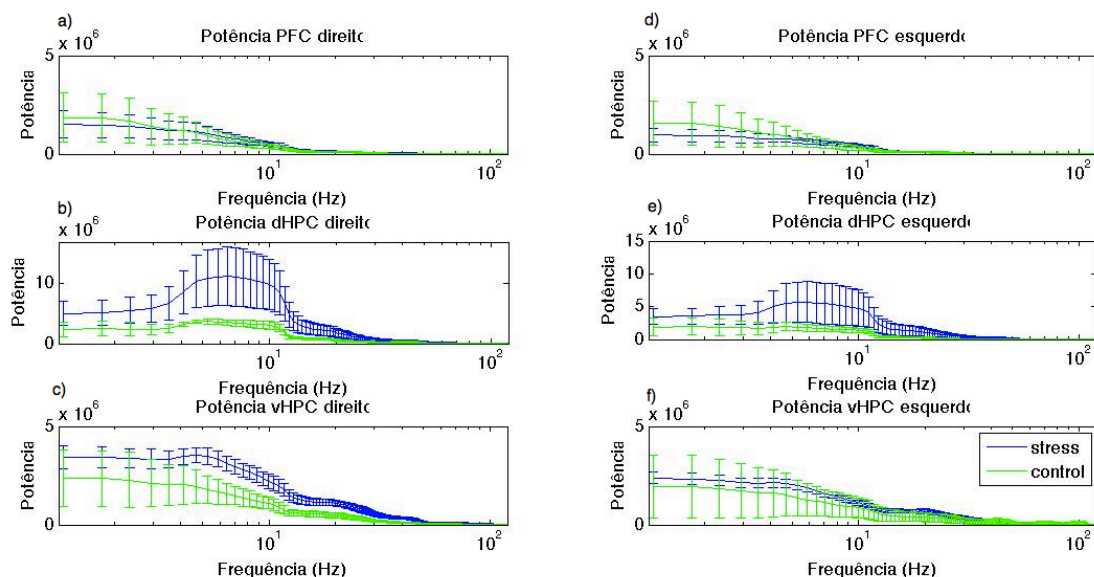


Figura 33: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo do espectro de potência nos segmentos dos braços fechados do EPM nas regiões: a) PFC direito, b) dHPC direito, c) vHPC direito, d) PFC esquerdo, e) dHPC esquerdo, e) dHPC esquerdo, f) vHPC esquerdo, em que a linha azul representa a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e a linha verde representa a média do grupo de controlo (3 animais).

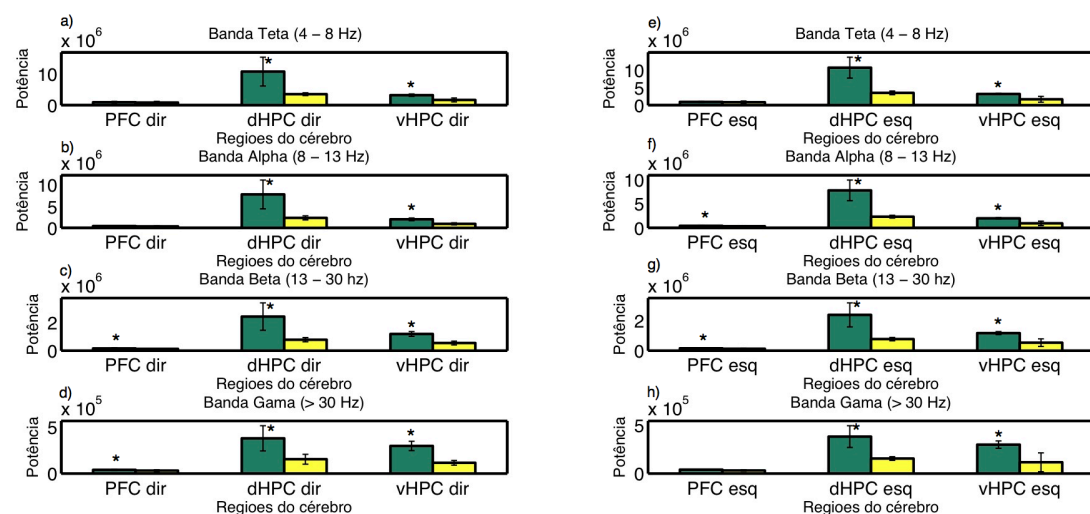


Figura 34: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo dos espectros de potência para todas as regiões cerebrais nos segmentos dos braços fechados do EPM seleccionados automaticamente nas bandas de frequência: a e e) Teta (4 – 8 Hz), b e f) Alfa (9 – 13 Hz), c e g) Beta (13 – 30 Hz) e d e h) Gama (>30 Hz) para os hemisférios direito do cérebro e esquerdo do cérebro em que as barras verdes representam a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e as barras amarelas representam a média do grupo de controlo (3 animais).

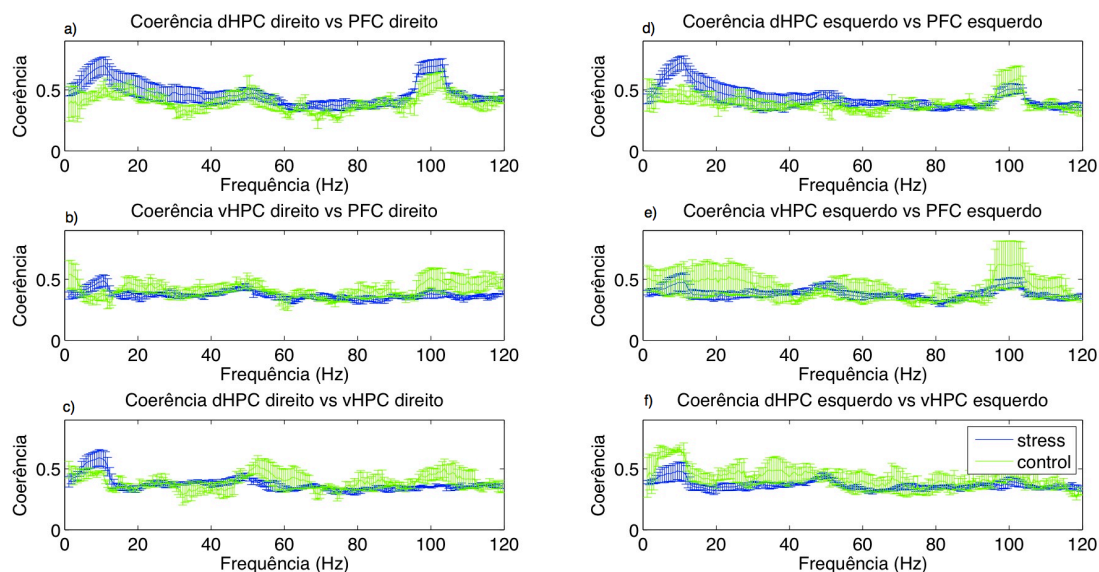


Figura 35: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo da coerência nos segmentos dos braços fechados do EPM entre: a) dHPC direito – PFC direito, b) vHPC direito – PFC direito, c) dHPC direito – vHPC direito, d) dHPC esquerdo – PFC esquerdo, e) vHPC esquerdo – PFC esquerdo e f) dHPC esquerdo – vHPC esquerdo, em que a linha azul representa a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e a linha verde representa a média do grupo de controle (3 animais).

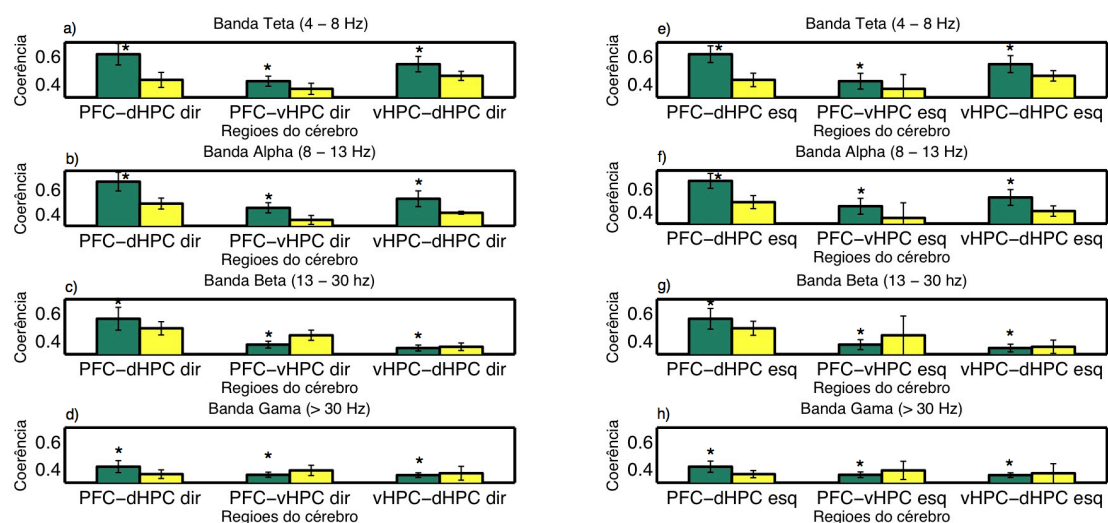


Figura 36: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo das coerências para todas as combinações de regiões cerebrais nos segmentos dos braços fechados do EPM obtidos de forma automática nas bandas de frequência: a e e) Teta (4 – 8 Hz), b e f) Alfa (9 – 13 Hz), c e g) Beta (13 – 30 Hz) e d e h) Gama (>30 Hz) para os hemisférios direito e esquerdo do cérebro em que as barras verdes representam a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e as barras amarelas representam a média do grupo de controle (3 animais).

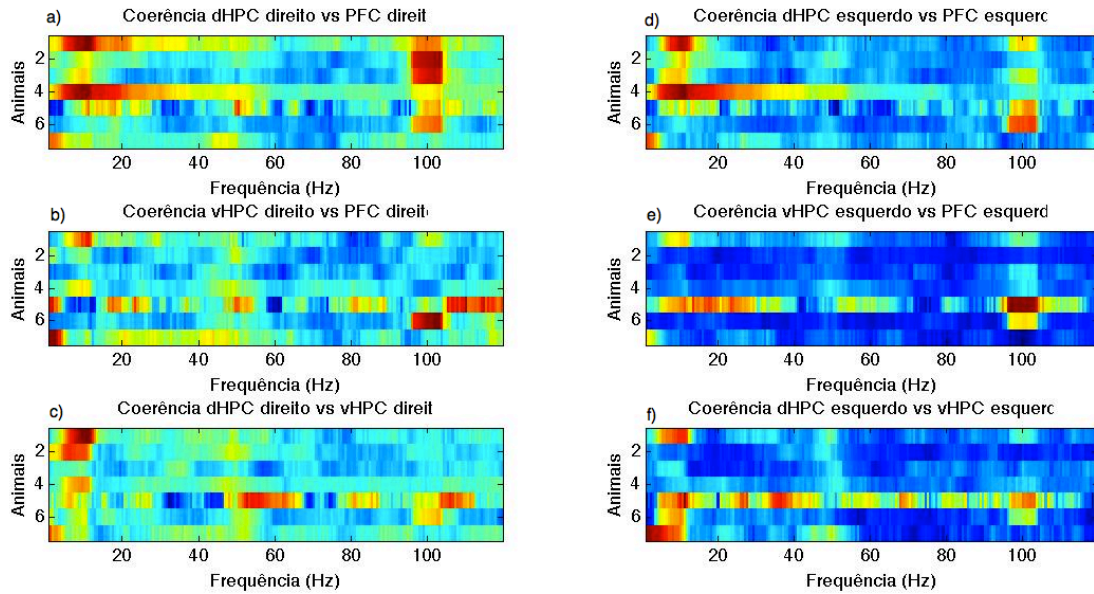


Figura 37: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo da coerência (representada em código de cores) nos segmentos dos braços fechados do EPM para cada animal (as 4 primeiras linhas referem-se ao grupo de animais stressados e os ultimas 3 ao grupo de animais de controlo) entre: a) dHPC direito - PFC direito, b) vHPC direito - PFC direito, c) dHPC direito - vHPC direito, d) dHPC esquerdo - PFC esquerdo, e) vHPC esquerdo - PFC esquerdo e f) dHPC esquerdo - vHPC esquerdo.

4.4 T-Maze

Os gráficos seguintes (Figuras 38 e 39) representam a coerência (em código de cores) ao longo das posições entre as diferentes áreas cerebrais para os vários *trials* (2ª parte) realizados no último dia de testes com o TM. Os gráficos não apresentam médias; apenas apresentam uma sobreposição do calculo de coerência para todos os *trials*.

Os gráfico da Figura 38 representa a coerência na banda teta e o gráfico da Figura 39 representa a coerências na banda gama.

Pela análise das Figuras nota-se a coerência entre o PFC e o dHPC é mais elevada na banda teta. As coerências são mais baixas na banda gama.

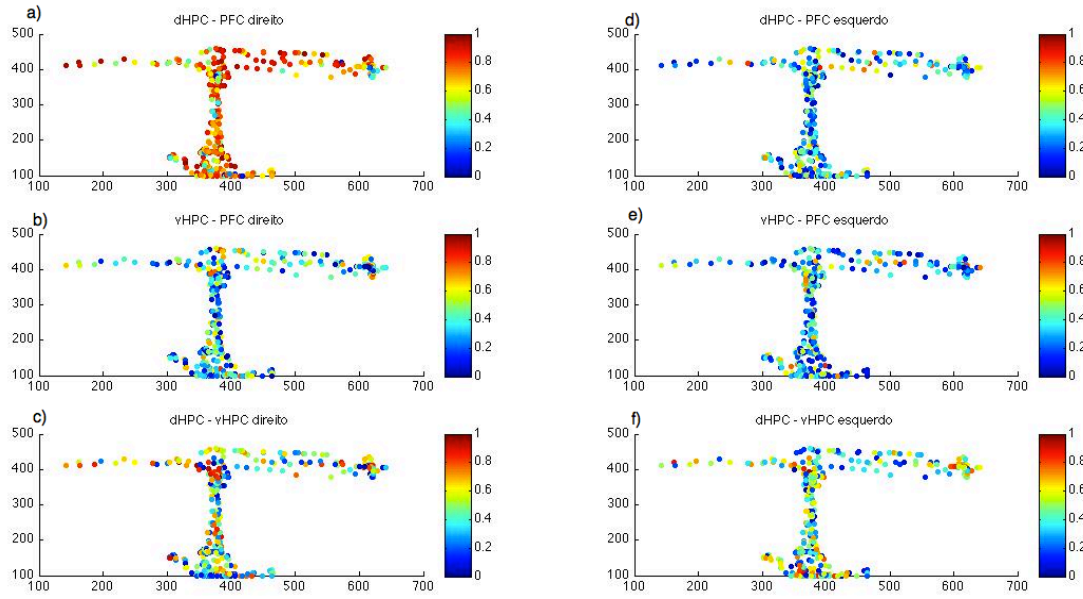


Figura 38: Representação da coerência (banda de frequências teta) em janelas de 240 pontos (200 milissegundos) para um dos animais do grupo de CUS em todos os *trials* (segunda parte do *trial*) entre a) dHPC direito – PFC direito, b) vHPC direito – PFC direito, c) dHPC direito – vHPC direito, d) dHPC esquerdo – PFC esquerdo, e) vHPC esquerdo – PFC esquerdo e f) dHPC esquerdo – vHPC esquerdo.

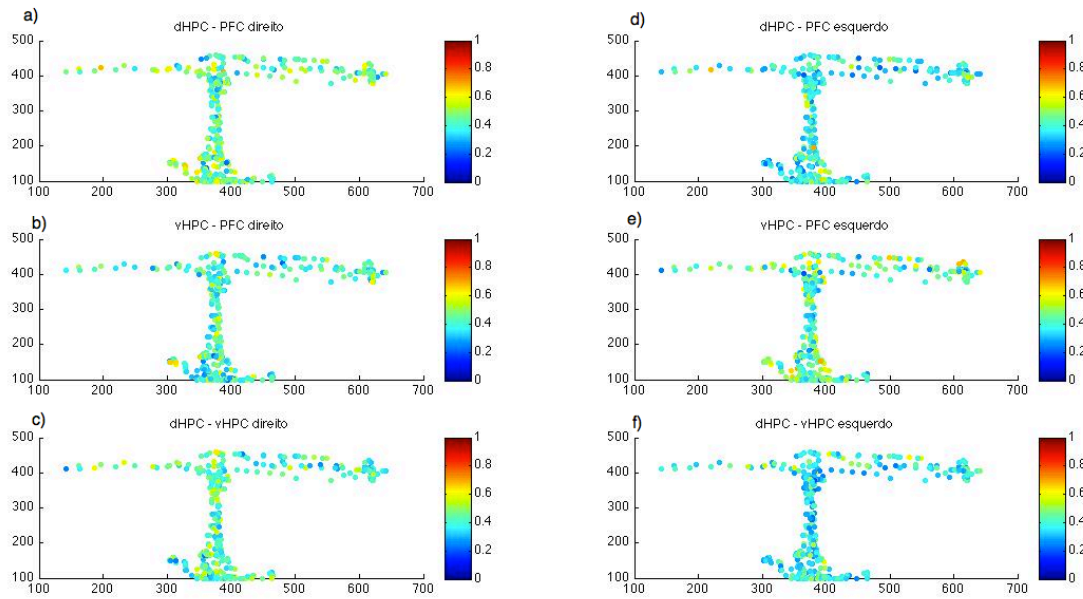


Figura 39: Representação da coerência (banda de frequências Gama) em janelas de 240 pontos (200 milissegundos) para um dos animais do grupo de CUS em todos os *trials* (segunda parte do *trial*) entre a) dHPC direito – PFC direito, b) vHPC direito – PFC direito, c) dHPC direito – vHPC direito, d) dHPC esquerdo – PFC esquerdo, e) vHPC esquerdo – PFC esquerdo e f) dHPC esquerdo – vHPC esquerdo.

CAPÍTULO 5

Discussão dos Resultados E CONCLUSÕES

A aplicação desenvolvida permite integrar eficazmente a análise neuronal com a análise de comportamento. Isto é fundamental quando se pretende analisar dados neuronais adquiridos durante o desempenho de testes de comportamento.

A aplicação desenvolvida, oferece uma interface gráfica que permite uma melhor navegação pelas opções disponíveis. Além disso, permite a escolher o número de grupos de animais a analisar bem como do número de animais em cada grupo e fazer o carregamento (*load*) dos respectivos ficheiros. Também na interface é possível escolher o tipo de teste a analisar (OF, EPM, TM). É ainda possível seleccionar dois parâmetros da função de cálculo de espectro de potência e coerências nomeadamente o tamanho das janelas temporais e a sobreposição das mesmas.

As funções implementadas foram validadas com recurso a sinais electrofisiológicos (LFPs) de animais cronicamente implantados e em movimento livre num estudo de stress crónico. A intenção é reportar os efeitos do stress crónico ao nível dos espectro de potência dos sinais em cada área cerebral e das coerências (medida de coordenação entre duas áreas do cérebro) entre o hipocampo e o PFC. Tal como já foi referido, o hipocampo e o PFC são estruturas cerebrais importantes na regulação da resposta adequada a ambientes stressantes. A avaliação das alterações electrofisiológicas nestas estruturas cerebrais devidas ao stress crónico é um estudo inovador uma vez que tais alterações nunca antes foram reportadas.

5.1 Segmentação automática e Análise Automática de Comportamento

De forma a conseguir separar os dados em fragmentos importantes para a análise vários algoritmos de segmentação automática foram implementados. Existem algoritmos para segmentar a actividade basal, a actividade no OF e no EPM. Os resultados obtidos com os diversos algoritmos nos diversos testes foram em geral satisfatórios.

A segmentação automática (por ser feita independentemente do utilizador) tem vantagens pois evita as variações que naturalmente são introduzidas quando o utilizador segmenta o sinal segundo o seu próprio critério. A segmentação automática também ajuda na análise automática do comportamento dos animais. De facto, em testes como o OF e o EPM foi o único método disponível para segmentar os sinais uma vez que os aparatos utilizados para os testes não possuíam qualquer tipo de marcas que guiassem a segmentação manual (nem existia um *software* disponível que desempenhasse funções semelhantes).

Na segmentação aplicada à actividade basal, baseada em *thresholds* de deslocamento e de velocidade, o algoritmo apresenta um fraco desempenho. Foram então analisados os resultados obtidos para três valores diferentes de *threshold* de velocidade. Pela análise da tabela 1 onde se encontram os valores médios de segundos seleccionados correctamente e incorrectamente (de acordo com a segmentação manual) pode-se ver que as percentagens rondam todas as 50%. Apesar de, ao se aumentar o *threshold*, a percentagem de resultados certos subir também a percentagem de períodos certos não seleccionados aumenta. Por outro lado, diminuindo o *threshold* e aumenta a percentagem de segundos errados seleccionados. No entanto, não existem grandes diferenças entre os resultados para os vários valores de *threshold*. Idealmente deveria utilizar-se um valor intermédio, não tão baixo que a percentagem de segmentos incorrectamente seleccionados fosse muito elevada mas não tão alta que a percentagem de segmentos correctos não seleccionados fosse também elevada. Posto isto, a escolha do valor de *threshold* é um parâmetro limitador no algoritmo.

Apesar de tudo, os resultados obtidos com a aplicação deste algoritmo são preliminares, e futuras melhorias deverão ser implementadas de forma a torna-lo mais robusto. Um factor que poderia melhorar a performance do algoritmo seria a utilização de uma arena de gravação maior onde o animal se pudesse deslocar ao longo de maiores

distancias. A arena onde as presentes gravações foram efectuadas era pequena fazendo com que com que as distâncias que o animal percorre nunca sejam muito longas. A utilização de uma arena de gravações maior poderia ser benéfica os resultados alcançados pelo algoritmo desenvolvido. O algoritmo selecciona frequentemente períodos curtos referentes à situação em que o animal apenas mexeu a cabeça, por confundi-los com períodos em que o animal efectivamente andou mas durante uma distancia pequena. Numa arena maior seria possível colocar os valores de *threshold* de distancia mais elevados o que poderia levar a que segmentos em que o animal apenas mexe a cabeça não fossem seleccionados.

A inclusão de um classificador para identificar padrões de movimento através dos parâmetros distância e velocidade poderia ser útil. Este classificador poderia ser, por exemplo, uma rede neuronal. Deste modo, o algoritmo e segmentação inicial deveria estar preparado para seleccionar, à partida, não exactamente os segmentos certos, mas os segmentos de interesse. Posteriormente seriam extraídas características (velocidade média, deslocamento entre outras) destes segmentos de interesse e a selecção seria então refinada como a ajuda do classificador.

O classificador devia ser treinado de modo a conhecer os segmentos certos para que, depois de extraídos todos os segmentos de interesse, apenas estes permanecessem. Esta seria uma possibilidade para uma futura melhoria no algoritmo de selecção de segmentos da actividade basal (exploração de uma arena familiar).

Apesar das limitações do algoritmo de segmentação das períodos basais, os restantes algoritmos apresentam resultados satisfatórios. Conseguiu-se de uma forma eficaz seleccionar segmentos da actividade neuronal nas diferentes regiões dos testes de comportamento e com isso calcular os espectros de potencia e as coerências.

Outros algoritmos foram implementados para segmentar a actividade nos testes de comportamento OF e EPM. Esta segmentação foi feita segundo a posição do LED instalado no implante de cada animal. Estes algoritmos conseguem distinguir, de forma clara, as diferentes regiões pré-determinadas de cada um dos testes. Tal como se pode verificar nas Figuras 25 e 32, representam os pontos do *tracking* pertencentes aos segmentos seleccionados automaticamente para o OF e EPM, respectivamente, pode-se verificar que estes correspondem às regiões certas.

Uma vez que os algoritmos de segmentação automática se baseiam na posição do LED instalado na cabeça do animal, se o animal apresentar o corpo inteiro numa região e a cabeça numa região diferente (o que pode acontecer uma vez que os animais

são suficientemente grandes para tal) esse tempo é contabilizado para a região onde se encontra a cabeça. Seria uma melhoria futura a distinção entre entrada numa determinada região com a totalidade do corpo ou apenas com a cabeça. Esta limitação é particularmente importante na análise do tempo despendido em cada região do teste e uma futura melhoria a este nível poderia resultar em análises mais precisas do comportamento dos animais nos testes. Esta melhoria poderia ser implementada do seguinte modo: Ao ser detectada uma entrada numa determinada região do teste deveria ser calculada a distancia percorrida pelo animal. Se esta distância percorrida fosse maior que um determinado *threshold* a entrada seria contabilizada como cruzamento com o corpo inteiro. Se não, a entrada seria contabilizada como uma entrada apenas da cabeça. O *threshold* de distância utilizado deveria ser suficiente para permitir ao animal entrar com o corpo inteiro, ou seja, deveria ser no mínimo igual ou maior do que o comprimento médio dos animais.

Outra limitação que é imposta ao algoritmo pelo sistema de aquisição acontece porque a posição do LED é por vezes perdida, devido, por exemplo, a reflexos nas paredes do aparato de teste. As posições que ficam perdidas são substituídas pela ultima posição viável que o *tracking* recolheu. Estes erros são limitadores. De facto, as posições perdidas podem ser assumidas para uma área à qual na realidade não pertenceriam. Sendo assim, existem aspectos da segmentação automática e da análise automática de comportamento (tempo despendido nas diversas áreas e número de cruzamentos / entradas) que ficam comprometidos. Este mesmo problema acontece quando o animal cai do teste (que só pode ocorrer, embora muito raramente, no caso dos braços abertos do EPM). Nestas situações, no *software* assumiu-se a última posição do animal antes de este cair, aumentando inevitavelmente aumentar o tempo despendido nos braços abertos. Estas limitações são impostas aos algoritmos devido ao sistema de aquisição.

O primeiro problema pode ser ultrapassado logo na aquisição. Isto é, através da utilização de caixas de gravação opacas. Este tipo de caixas apresentam poucos reflexos o que diminuiria o número de posições perdidas no *tracking*. O segundo problema é difícil de evitar, mas pode-se preparar o algoritmo para lidar com ele. Numa futura versão deste sistema, poderia implementar-se um algoritmo para detecção de quedas do EPM. Este algoritmo identificaria as quedas ocorridas e eliminava o tempo passado desde a queda do animal até à sua reposição no teste para evitar que este fosse contabilizado como tempo despendido nos braços abertos.

Por fim, outras das limitações importantes impostas aos algoritmos de segmentação automática e análise automática do comportamento são os limites dos testes determinados pelo utilizador através da marcação de quadrados por cima de uma das imagens do *video-tracking*. Uma correta marcação dos limites do teste nesta fase é essencial uma vez que algoritmo se baseia neste limites para determinar as várias regiões.

Uma má imagem recolhida através do sistema de *video-tracking*, onde as diferentes zonas sejam de difícil marcação pode produzir resultados negativos. De facto, para que o algoritmo funcione bem é necessário que a aquisição do vídeo e *tracking* também se processe de uma forma correta. A má marcação das zonas do teste assim como problemas no *tracking* dos animais durante o teste levam a resultados menos precisos do algoritmo ao nível da segmentação automática que depois vão ter repercussões nos resultados neuronais e também nos resultados de comportamento.

Sumariando, a correta aquisição do vídeo-*tracking* durante as gravações é um ponto limitante no correto funcionamento dos algoritmos de segmentação automática e consequentemente nos algoritmos de avaliação automática do comportamento. Deve-se então assegurar que este aspecto da aquisição seja optimizado. Esta optimização deve ser conseguida utilizando as melhores condições de luminosidade possíveis, ou seja, não tão claro que a luz emitida pelo LED não seja reconhecida, mas nem tão escuro que as regiões do teste não sejam visíveis para a marcação através do algoritmo. Deve também assegurar-se que o teste está correctamente alinhado e enquadrado no vídeo (deve assegurar-se que todas as regiões do teste são visíveis). Optimizando então todos estes parâmetros, a aquisição do vídeo-*tracking* é também optimizada conjuntamente com a performance dos vários algoritmos de segmentação e análise automática de sinais que dela dependem.

Por fim, a segmentação aplicada no TM. Esta segmentação permite uma análise de coerências ao longo das posições no teste em janelas de 200 milissegundos. Para cada janela são calculadas coerências e o resultado é a média (numa determinada banda de frequências) colocada no gráfico numa escala de cores. Os gráficos resultantes são conseguidos a partir de uma sobreposição do cálculo de coerências para cada *trial*, sem recurso a médias. O calculo da coerência é feito para as diferentes bandas de frequência (teta, alfa, beta e gama).

Uma vez que não se encontraram diferenças notórias entre as 3 primeiras bandas (teta, alfa e beta) apenas a banda teta e gama se encontram representadas nos resultados,

sendo que as restantes se encontram em anexo. Pela análise das Figuras (38 e 39) nota-se que na banda teta a coerência entre o PFC e o dHPC é mais elevada e que na banda gama as coerências são mais baixas.

Os dados electrofisiológicos representados nos gráficos podem revelar uma tendência mas não são conclusivos, uma vez que apenas representam a actividade de um animal. De facto, alguns problemas durante a realização do TM levaram a grande maioria dos animais fossem excluídos. Futuros testes com maior número de animais podem resultar em resultados mais conclusivos no TM. Sendo assim, estes gráficos apenas pretendem mostrar um dos diferentes *outputs* que a ferramenta é capaz de realizar. Este é apenas um protótipo e apenas pretende mostrar o futuro caminho para gráficos semelhantes nos diversos testes de comportamento. Este tipo de gráfico muito interessante pois permite uma correlação bastante intuitiva entre posição e coerência ou potência do sinal. Numa futura versão desta ferramenta deverão ser incluídos gráficos de médias de *trials* para os diferentes grupos de animais e para outros testes de comportamento. Outra melhoria seria a inclusão de uma média de coerências entre *trials* quando as posições fossem coincidentes.

5.2 Análise neuronal e comportamental

Os dados neuronais correspondentes às gravações da actividade basal (actividade dos animais numa arena familiar) foram gravados durante 21 dias segundo o protocolo de gravações em Anexo. Durante esses dias foi aplicado o protocolo de stress crónico e imprevisível (CUS) nos animais do grupo de teste.

Deste modo, calcularam-se (através dos métodos descritos no capítulo 3) as coerências e espectros de potência para todas as regiões cerebrais durante os períodos de actividade seleccionados de forma manual. Tal como indica o protocolo, a actividade dos grupos de animais (controlo e stress) foi gravada em dias separados durante os 21 dias. Deste modo, a análise neuronal fez-se de forma separada para os primeiros dias do protocolo e para os últimos dias. O objectivo desta análise é verificar a existência de diferenças electrofisiológicas entre os grupos que apareçam depois da aplicação do protocolo de stress e que não estivessem presentes no início do mesmo. Estas diferenças, a existir, poderão relacionar-se com os efeitos do stress crónico na actividade cerebral.

Tal como foi referido, o hipocampo e o córtex pré-frontal são duas das áreas do

cérebro responsáveis pela resposta comportamental adequada perante uma situação de stress ou ansiedade. Tal como também foi demonstrado previamente, o stress crónico causa um rearranjo nas dendrites apicais dos neurónios piramidais do PFC que são precisamente os que recebem projecções do hipocampo [12]. Tal facto pode sugerir que, o stress crónico afecte a conexão entre o PFC e o hipocampo o que poderá produzir alterações electrofisiológicas ao nível dos espectros de potência de cada área e da coerência entre as duas regiões cerebrais. Apesar destes trabalhos anteriores parecerem apontar para uma espectável queda de coerências entre o hipocampo e o PFC do grupo dos animais sujeitos a CUS em relação ao grupo de controlo a análise de coerências entre o PFC e o hipocampo em ratos acordados e em movimento livre nunca foi reportada pelo que os resultados esperados não são de todo óbvios [12].

Os resultados apresentados na presente discussão foram obtidos a partir das gravações com um grupo pequeno de animais (3 controlos e 4 CUS). De facto, o estudo no qual este trabalho se encontra inserido ainda esta a decorrer e gravações com grupos maiores de animais serão efectuadas em breve. Sendo assim, os resultados electrofisiológicos aqui apresentados e discutidos devem sempre ser analisados cuidadosamente à luz destas limitações. Comparando os resultados obtidos para os primeiros dias de gravações com os resultados obtidos para os últimos dias de gravações, pode-se verificar que existe um aumento da potencia do sinal do grupo de CUS em relação ao grupo de controlo. Este aumento acontece principalmente para a potencia dos sinais electrofisiológicos do hipocampo dorsal. Tal como se pode verificar nos gráficos de potência correspondentes aos primeiros dias de gravações (Figura 14 e 15), não existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos. De facto, estes gráficos correspondem ao inicio do protocolo de stress e não seriam espectáveis quaisquer diferenças entre grupos. No entanto, nos gráficos correspondentes aos últimos dias de gravações, as diferenças aparecem. Tal como se confirmar nas Figuras 16 e 17, aparece um aumento generalizado da potência do sinal para todas as bandas de frequência. Este aumento é mais notório na região dorsal do hipocampo.

Conforme referido anteriormente e para a verificar como o protocolo de stress crónico e imprevisível afectou o comportamento dos animais, foram efectuados testes de comportamento. Os testes de comportamento realizados foram o OF, o EPM, o TM e o HB.

Começando pelos resultados obtidos a nível de comportamento no OF (Figura 25) pode-se verificar que no que diz respeito ao tempo despendido pelos animais em cada

uma das regiões do OF e a percentagem de cruzamentos em cada uma dessas áreas, não existem diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de stress e o grupo de controlo. Ambos os grupos mostraram uma natural inclinação para permanecer nas regiões da periferia do teste. No entanto, seria de esperar que os animais do grupo de stress passassem menos tempo no centro que os animais do grupo de controlo, o que não aconteceu. Por outro lado, ao nível dos dados electrofisiológicos não se verificaram diferenças entre os dados gravados na região central do teste e os dados gravados na periferia do teste. A existirem diferenças entre os grupos, estas poderiam manifestar-se nas zonas de transição entre as duas áreas de testes, contudo esta análise não foi realizada.

Um outro exemplo de uma melhoria futura é a implementação de um tipo de segmentação que seleccione apenas os segmentos, onde o animal cruza-se entre as diferentes regiões do teste para avaliar as diferenças electrofisiológicas que possam ocorrer nestas regiões.

A nível electrofisiológico, os resultados obtidos no OF não mostraram diferenças entre os segmentos seleccionados automaticamente do centro do aparato e da periferia do aparato. Sendo assim, os resultados dos espectros de potência e das coerências dos segmentos da periferia podem ser consultados em anexo.

Analisando então os gráficos das Figuras 26 e 27 pode-se ver que, tal como acontecia nos gráficos de potência correspondentes aos últimos dias do protocolo de stress (Figuras 16 e 17), existe um aumento generalizado da potência do sinal para o grupo de CUS (que é mais notório para o dHPC). Nos gráficos correspondentes ao centro do OF pode-se verificar que todas as diferenças encontradas são estatisticamente significativas (o que não acontece nos gráficos correspondentes aos últimos dias do protocolo). Ao nível das coerências continuam a notar-se as mesmas diferenças que já apareciam nos últimos dias do protocolo de stress. Analisando os gráficos das Figuras 28 e 29 pode-se verificar que também aqui a coerência entre o dHPC e PFC aumenta em para o grupo de stress em relação ao grupo de controlo. As coerências entre o dHPC e PFC são sempre maiores do que as coerências entre o vHPC e o PFC e também nestas se nota um aumento do grupo de stress em relação ao grupo de controlo. Para o caso do vHPC – dHPC também o grupo de stress se encontra aumentado em relação ao grupo de controlo, principalmente nas bandas de frequências mais baixas (teta e alfa).

No caso do EPM, em ambos os grupos a preferência foi para a permanência nos braços fechados do aparato. Neste teste existe uma diferença entre o grupo de stress e de

controle. O grupo de controle apresentou uma maior percentagem de tempo total dispendido nos braços abertos do EPM e ambos os grupo permaneceram o mesmo tempo na zona central do teste. No entanto e mais uma vez, as diferenças entre o grupo de controle e o grupo de teste não são estatisticamente significativas.

A nível electrofisiológico, os resultados obtidos no EPM não mostraram diferenças entre o segmentos seleccionados de forma automática nas diferentes regiões do aparato de teste. Sendo assim, os resultados de espectros de potência e coerências dos segmentos dos pertencentes aos braços abertos e ao centro podem ser consultados em anexo.

Analizando os resultados referentes aos espectros de potência nos segmentos seleccionados de forma automática nos braços fechados (Figuras 33 e 34) pode-se verificar que tal como acontece nos restantes casos, a potência dos grupo de stress das varias áreas cerebrais se encontra aumentada em relação ao grupo de controle. Mais uma vez, como foi verificado nos restantes gráficos, as potências calculadas no dHPC são sempre bastante maiores do que as calculadas nas restantes áreas cerebrais (vHPC e PFC).

Ao nível dos gráficos de coerências calculadas para as diferentes áreas cerebrais (Figuras 35 e 36) pode-se verificar que tal como acontece para os restantes gráficos, a tendência é para um aumento da coerência do grupo de stressado em relação ao grupo de controle, entre as varias áreas cerebrais para os varias gamas de frequências. Tal como acontece nos restantes gráficos, também aqui as coerências maiores aparecem para as bandas mais baixas (teta e alfa). Apenas nas bandas mais altas (beta e gama) é que parece haver uma tendência de inversão, ou seja, de as coerências do grupo de controle serem maiores do que as de stress. Esta inversão aparece entre o PFC–vHPC e vHPC–dHPC.

Os resultados dos restantes testes de comportamento não se apresentam na presente dissertação. Optou-se pela sua não-inclusão por dois motivos: o primeiro é que a análise comportamental nestes dois testes foi realizada inteiramente manual (através da visualização dos vídeos). Assim, esta plataforma de análise de sinais não faz análise automática de comportamento para o caso do TM e HB. O segundo motivo é que os resultados não foram conclusivos, mais uma vez os resultados de comportamento não mostram diferenças entre grupos.

Resumindo, a nível de comportamento, não existem diferenças entre o grupo de controle e o grupo de stress. Por um lado, pode ser que o protocolo de stress aplicado

nos animais não tenha sido eficaz. Esta falta de eficácia do protocolo de stress pode dever-se ao facto de os animais terem desenvolvido um mecanismo de resiliência que os tornou resistentes. Esta resiliência pode ter sido adquirida por exemplo, por se ter repetido o horário da aplicação dos stressores em alguns dias consecutivos do protocolo. Por outro lado pode ser que pela permanência no mesmo alojamento, os animais do grupo de controlo tenham ficado também eles stressados.

Deve-se dizer que num grupo de ratos sujeitos ao protocolo de CUS é comum a existência de 1 ou 2 ratos que por vários motivos (resiliência e outros) não são afectados pelo stress. O que não é comum é que tal tenha acontecido com todos os ratos do grupo.

As conclusões sobre a análise dos resultados desta experiência, onde se comparam os efeitos do stress crónico na actividade cerebral em ratos cronicamente implantados e em movimento livre não são o objectivo principal desta dissertação. Os dados analisados nesta tese fazem parte de uma experiência que envolve um grupo maior de animais e ainda se encontra em curso. No entanto, a preparação teórica para a correta compreensão e participação nesta experiência permite à autora esboçar alguns comentários críticos sobre os resultados obtidos para estes grupos de animais. Note-se contudo, que o grupo de animais analisado nesta tese é reduzido e que quaisquer conclusões que possam ser retiradas do mesmo devem ser interpretadas com precaução.

Para além das melhorias mencionadas ao longo desta discussão, poderiam-se implementar outras numa futura versão deste programa.

Um dos aspectos que pode ser melhorado em futuras versões desta ferramenta é a interface gráfica. Seria uma futura melhoria da interface a inclusão de um maior número de parâmetros e de *outputs* gráficos. Sendo assim, uma futura versão da interface gráfica deverá apresentar uma melhoria ao nível dos menus disponíveis. Um destes novos menus deverá permitir ao utilizador indicar o canal de referência para cada animal e deverá permitir a identificação de cada gravação com um nome específico. O canal de referencia é o canal o qual os sinais estão referenciados. Esta referenciação pode ser feita no *hardware* (o sistema de aquisição permite que se faça uma referenciação a qualquer dos canais durante a gravação) ou pode ser feita posteriormente. Assim o sistema deverá permitir a escolha do canal de referência a partir da interface gráfica. Deste modo, o utilizador pode definir qual o canal de referencia a usar e comparar resultados utilizando referencias diferentes. No presente

trabalho a referência é feita no código e só pode ser alterada a partir do mesmo. Outra opção importante é a que permite ao utilizador activar ou desactivar a referência. Isto é, se os sinais a analisar já possuírem uma referência anterior, o utilizador poderá escolher não utilizar esta referência feita pelo *software*.

Neste momento, apenas são dados nomes aos grupos de animais e não a um animal em particular. Outro menu também interessante de colocar numa futura versão é o permita ao utilizador escolher quais as regiões do cérebro onde se realizam os cálculos de espectros e coerências. Neste momento, a função calcula espectros e coerências de todos os canais disponíveis, não permitindo qualquer pré-selecção.

Outra das melhorias poderia acontecer ao nível dos *outputs* gráficos. Assim, um dos *outputs* que poderão ser incluídos em futuras versões são os que oferecem uma representação da média de coerências e espectros em código de cores sobrepostos numa imagem (ou representação gráfica) do teste. Tal permite uma visualização mais intuitiva dos dados electrofisiológicos e a sua correlação com o comportamento do animal no teste em análise. De forma similar ao que já é feito com o TM, poderia se estender deste tipo de representação gráfica dos dados electrofisiológicos para outros testes de comportamento. Por exemplo, nos dados referentes ao *Hole Board*, onde neste momento não foi implementada nenhuma segmentação automática, uma separação da arena em quadrados permitiria avaliar diferenças (a existirem) dos dados electrofisiológicos nos animais quando estes estão nos buracos com ou sem recompensa e até de quando estão perto de um buraco ou estão numa zona mais periférica.

Outra melhoria a implementar no sistema é a inclusão de outros testes estatísticos. Nesta versão implementou-se o teste *t-student* para amostras independentes mas futuramente deverão ser oferecidas ao utilizador outras possibilidades para escolher um teste mais adequado aos seus dados. Outra melhoria a implementar em termos de análises estatísticas é a possibilidade de realizar os testes estatísticos não apenas entre o grupo de controlo e o grupo de teste mas entre grupos de controlo e stress em ocasiões diferentes do testes. Assim, neste caso, poderiam ser avaliadas as diferenças entre o grupo de teste nos primeiros dias de gravação e os últimos ou entre o grupo de testes para a região central do OF e região periférica do OF.

Neste momento, o programa trabalha com ficheiros no formato .MAT. Este formato é conseguido a partir de uma função de importação especificamente desenvolvida para os ficheiros binários (.BIN) que eram gerados a partir do sistema de aquisição. Uma possível melhoria para o programa seria a inclusão de um menu para

importação de vários tipos de ficheiros (gerados a partir de diferentes sistemas de aquisição) onde também fosse possível fazer outros tipos de pré-processamento. Poderiam ser criadas opções que permitissem ao utilizador trocar a ordem dos canais de gravação ou utilizar uma função de decimação (onde se poderia optar pelo factor de decimação conveniente).

BIBLIOGRAFIA

- [1] Adhikari, A., Topiwala, M., & Gordon, J. (2010). Synchronized Activity between the Ventral Hippocampus and the Medial Prefrontal Cortex during Anxiety . *Neuron* , 65, 257-269.
- [2] Andrews, P., Bokil, H., Kaur, S., Loader, C., Maniar, H., Mehta, S., et al. (2008). *The Chronux Manual*. Obtido em 1 de 5 de 2011, de <http://chronux.org/files/>
- [3] Axona. (s.d.). *Data acquisition systems for in vivo neuronal recording: Turnkey solutions for behavioral physiology*. Obtido em 11 de 10 de 2011, de www.axona.com
- [4] Balleine, B. (2007). The Neural Basis of Choice and Decision Making. *The journal of Neuroscience* , 31, 8159-8160.
- [5] Benchenane, K., Peyrache, A., Khamassi, M., Tiemey, P., & Gioanni, Y. (2010). Coherent Theta Oscillations and Reorganization of Spike Timing in the Hippocampal-Prefrontal Network upon Learning. *Neuron* , 921-936.
- [6] Brasil-Neto, J. (s.d.). *NeuroNews-Notícias de Neurociências* . Obtido em 20 de 8 de 2011, de <http://sadato.hypermart.net/weblog/>
- [7] Bremner, J. (1999). Does Stress Damage the Brain? *Society of Biological Psychiatry* , 45, 797-805.
- [8] Buzsáki, G. (2006). *Rhythms of the Brain*. New York: Oxford University Press.
- [9] C., Bezung. (1999). Measuring exploratory behavior. In *Handbook of Molecular Genetic Techniques for Brain and Behavior Research (Techniques in the Behavioral and Neural science)the* (pp. 739-749). Amsterdam: Elsevier.
- [10] Casarrubea, Casarrubea, M., Sorbera, F., Santangelo, A., & Crescimanno, G. (2010). Microstructure of rat behavioral response to anxiety in hole-board. *Neuroscience Letters* , 481, 82-87.
- [11] Casarrubea, M., Sorbera, F., & Crescimanno, G. (2009). Structure of rat behavior in hole-board 1) multivariate analysis of responde to anxiety. *Physiology & Behavior* , 96, 174-179.
- [12] Cerqueira, J., Almeida, O., & Sousa, N. (2008). The stressed prefrontal cortex. Left? Right! *Brain, Behavior and Immunity* , 22, 630-638.
- [13] Cerqueira, J., Mailliet, F., Almeida, O., Jay, T., & Sousa, N. (2007). The Prefrontal Cortex as a Key to Target of Maladaptive Response to Stress. *The Journal of Neuroscience* , 27, 2781-2787.

- [14] Chen, Z., Haykin, S., Eggermont, J., & Becker, S. (2007). *Correlative Learning: Basis for Brain and Adaptive Systems*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- [15] Christian, K., Miracle, A., Wellman, C., & Nakazawa, K. (2011). Chronic Stress-Induced Hippocampal Dendritic Retraction Requires CA3 NMDA Receptors. *Neuroscience* , 174, pp. 26–36.
- [16] Clark, L., Cools, R., & Robbins, T. (2004). The neuropsychology of ventral prefrontal cortex: Decision Making and Reversal learning. *Brain and Cognition* , 55, 41-53.
- [17] Cook, S., & Wellman, C. (2004). Chronic Stress Alters Dendritic Morphology in Rat Medial Prefrontal Cortex. *Journal of neurobiology* , 60, 236–248.
- [18] Damasio, A. (2000). Eight C.U. Ariens lecture. The fabric of the mind: a neurobiological perspective. *Prog. Brain Res.* , 126, 457-467.
- [19] Davidson, R. (2002). Anxiety and Affective Style: Role of Prefrontal Cortex and Amygdala. *Society of Biological Psychiatry* , 51, 68-80.
- [20] Davies, A., Blakeley, A., & Kidd, C. (2001). *Human Physiology*. Churchill Livingstone.
- [21] Deacon, R., & Rawlins, N. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nature Protocols* , 12, 1-7.
- [22] DeCoteau, W., Thorn, C., Gibson, D., Courtemanche, R., Mitra, P., Kubota, Y., et al. (2007). Learning-related coordination of striatal and hippocampal theta rhythms during acquisition of a procedural maze task. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 104, 5644-5649.
- [23] Dias-Ferreira, E., Sousa, J., Melo, I., Morgado, P., Mesquita, A., Cerqueira, J., et al. (2009). Chronic Stress Causes a Frontostriatal Reorganization and Affects Decision-Making. *Science* , 325.
- [24] Doremus, T., Varlinskaya, E., & Spear, L. (2007). Factor analysis of elevated plus-maze behavior in adolescent and adult rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* , 83, 570–577.
- [25] *Dorland's Medical dictionary*. (1980). New York: Saunders Press.
- [26] Egert U, K. T. (2002). MEA-tools: an open source toolbox for the analysis of multielectrode-data with MATLAB. *J Neurosci Meth.* , 177, 33-42.
- [27] Espejo, E. (1997). Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. *Behavioural Brain and Research* , 87, 105-112.
- [28] Fell, J., & Axmacher, N. (2011). The role of phase synchronization in memory processes. *Nature* , 12, 105-118.

- [29] Ferneda, E. (2006). Redes neurais e sua aplicação em sistemas de recuperação de informação. *Ci. Inf.* , 35.
- [30] Gouirand, A., & Matuszewich, L. (2005). The effects of chronic and unpredictable stress on male rats in the water maze. *Physiology & Behavior* , 86, 21-31.
- [31] Gray, C. M. Tetrodes markedly improve the reliability and yield of multiple single-unit isolation from multi-unit recordings in cat striate cortex. *Journal of Neuroscience Methods* , 63, 43–54.
- [32] Harris, F. j. (1978). On the use of Windows for Harmonic Analysis with the Discrete Fourier Transform. *Proceedings of the IEEE* , 66, 1–83.
- [33] Henrie, J., & Shapley, R. (2005). LFP Power Spectra in V1 Cortex: The Graded Effect of Stimulus Contrast. *Journal of Neurophysiology* , 94, 479-490.
- [34] Hipp., J., Engel, A., & Siegel, M. (2010). Oscillatory Synchronization in Large-Scale Cortical Networks Predicts Perception. *Neuron* , 69, 387-396.
- [35] Hogg, S. (1996). A review of the validity and variability of elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* , 54, 21-30.
- [36] Joels, M., Karst, H., Krugers, H., & Lucassen, P. (2007). Chronic stress: Implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Frontiers of Neuroendocrinology* , 28, 72-96.
- [37] Kandel E.R., S. J. (2000). *Principles of Neural Science*. New York: McGraw-Hill.
- [38] Kloet , E., Joeld, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature* , 463-475.
- [39] Kruse, W., & Eckhorn, R. (1996). Inhibition of sustained gamma oscillations (35-80 Hz) by fast transient responses in cat visual cortex. *Proc. Natl Acad Sci USA* , 93, 6112-6117.
- [40] L. Hazan, M. Z. (2006). Klusters, NeuroScope, NDManager: a Free Software Suite for Neurophysiological Data Processing and Visualization. *J. Neurosci. Methods* , 155:207-216.
- [41] Lee Colgin, L., Denninger, T., Fyhn, M., Hafting, T., Bonnevie, T., Jensen, O., et al. (2009). Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. *Nature* , 462, pp. 353-358.
- [42] Lee, D., Rushworth, M., Walton, M., Watanabe, M., & Sakagami, M. (2007). Functional specification of the primate frontal cortex during decision making. *Journal of Neuroscience* , 27, 8170-8173.
- [43] Legatt, A. D. (1980). Averaged multiple unit activity as an estimate of phasic changes in local neuronal activity: effects of volume-conducted potentials. *Journal of Neuroscience Methods* , 2, 203-217.

- [44] Lepage, K. (2009). *Some Advances in the Multitaper Method of Spectrum Estimation*. PhD Thesis, Queen's University, Department of Mathematics and Statistics, Kingston, Ontario, Canada.
- [45] Leung, L. S. (2011). Field Potential Generation and Current Source Density Analysis. In R. P. Vertes, & R. W. Stackman Jr., *Electrophysiological Recording Techniques* (pp. 1-26). Florida, USA: Humana Press.
- [46] M.W. , J., & M.A., w. (2005). Theta rhythms coordinate hippocampal prefrontal interactions in spatial memory task. *PLoS Biol.* , 3.
- [47] McEwen, B. (2009). The Brain is the central organ of stress and adaptation. *NeuroImage* , 47, 911-913.
- [48] Mizoguchi, k., Yuzurihara, M., Ishige, A., Sasaki, H., Chui, D.-H., & Tabira, T. (2000). Chronic Stress Induces Impairment of Spacial Working Memory Because of Prefrontal Dopaminergic Dysfunction. *The Journal of Neuroscience* , 15, 1568-1574.
- [49] Muthukumaraswamy, S., & Singh, K. (2011). A cautionary note on the interpretation of phase-locking estimates with concurrent changes in power. *Clinical Neurophysiology* , 122, 2324–2327.
- [50] Oppenheim, A. V., Schafer, R. W., & Buck, J. A. (1999). Discrete-time signal processing. *Upper Saddle River* , 468–471.
- [51] Orfanidis, S. (2010). *Introduction to signal Processing*. (I. Prentice Hall, Ed.)
Paxinos, G., & Watson, C. (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (3 ed.). San Diego, California, USA: Academic Press, Inc.
- [52] Paxinos, G., & Watson, C. (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (3 ed.). San Diego, California, USA: Academic Press, Inc.
- [53] Pesaran, B. (s.d.). Spectral analysis of Neural signals. *Center for Neural Science* .
- [54] Pesaran, B. (2009). Undercovering the Mysterious origins of Local Field Potentials. *Neuron* , 61.
- [55] Press, W., Flannery, B., Teukolsky, S., & Vetterlinh, W. (1992). *Numerical Recipes in Fortran 77: The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press.
- [56] Prut, L., & Belzung, C. (2002). The Open Field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology* , 463, 3-33.
- [57] Rangayyan, R. (2002). *Biomedical signal analysis: a case-study approach*. New York: IEEE Press and Wiley.

- [58] Robert Oostenveld, P. F.-M. (2011). FieldTrip: Open Source Software for Advanced Analysis of MEG, EEG, and Invasive Electrophysiological Data. *Computational Intelligence and Neuroscience* .
- [59] Delorme A., Makeig S. (2004). EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics. *Journal of Neuroscience Methods* , 134, 9-21.
- [60] Seidenbecher, T., Laxmi, T., Stork, O., & Pape, H. Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science* , 301, 846-850.
- [61] Squire, L., Berg, D., Bloom, F., Du Lac, S., Ghosh, A., & Spitzer, N. (2008). *Fundamental Neuroscience*. San Diego, California, USA: Academic Press.
- [62] Talton, L. (2008). *UCLA Behavioral Testing Core Facility* . Obtido em 10 de 11 de 2011, de <http://btc.bol.ucla.edu/>
- [63] Technologies, N. (s.d.). *NeuroExplorer: Neurophysiological data analysis software*. Obtido de <http://www.neuroexplorer.com/>
- [64] The MathWorks, I. (2011). Obtido de <http://www.mathworks.com/>
- [65] Thompson, D. (1982). Spectrum Estimation and Harmonic Analysis. *Proceedings of the IEEE* , 70, 1055-1096.
- [66] Torres, C., & Escarabajal, M. (2002). Validation of a behavioral recording automated system in the elevated plus-maze test. *Life Sciences* , 70, 1751–1762.
- [67] Willsky, A., & Oppenheim, A. (1997). *Signals & Systems* (2 ed.). Prentice-Hall International, Inc.

ANEXOS

ANEXO 1

ALGORITMOS IMPLEMENTADOS

1.1 Algoritmo para o calculo da distância

O algoritmo implementado para o calculo das distâncias ao longo da matriz de coordenadas x e y do *tracking* encontra-se representado na Figura 40.

```

Dist = função_Dist (array_xy)
    MaxDist=0; //Distância Máxima
    Dist=0; //Distância
    arrayx=array_xy(:,1); //primeira_coluna do array_xy
    arrayy=array_xy(:,2); //segunda_coluna do array_xy
    Pos_inix=array_x(1); // primeira posição x do array das posições
    Pos_iniy=array_y(1); // primeira posição y do array das posições

    Para i=2 até última posição do array_xy
        Dist=Calcula_distâncias(array_x(i), array_y(i) , Pos_inix, Pos_iniy)
        Se (Dist>MaxDist)
            MaxDist=Dist;
        Senão
            Se (LastDist-Dist>Threshold)
                Dirch=[i];
                Pos_inix=array_x(i);
                Pos_iniy=array_y(i);
                MaxDist=0;
            MaxDist=Dist;
    
```

Figura 40: Algoritmo para o calculo das distâncias ao longo das posições (x,y) do *tracking*.

1.2 Algoritmo para o calculo da velocidade

O algoritmo implementado para o calculo da velocidade em janelas ao longo da matriz de coordenadas x e y do *tracking* encontra-se representado na Figura 41.

```
Velocidade = calc_velocidades (arrayxy, janela, Threshold2)
    arrayx=array_xy(:,1); //primeira_coluna do array_xy
    arrayy=array_xy(:,2); //segunda_coluna do array_xy

    Velocidade=zeros(tamanho(array_xy)) //vector velocidade inicializado a zero
    Para i= janela até tamanho_array_xy
        D=Calcula_distâncias(array_x(i), array_y(i) , array_x(i-janela), array_y(i-
        janela));
        Velocidade=(D/janela)*5ms;
```

Figura 41: Algoritmo implementado para o cálculo das velocidades ao longo do vector de posições x e y do *tracking* em janelas de n pontos.

1.3 Algoritmo para a segmentação automática

O algoritmo implementado para a extracção dos segmentos do sinal de forma automática de acordo com o critério utilizado para cada teste de comportamento. O algoritmo encontra-se representado na Figura 41.

```
[Segmentos, tempoD] = função_segmentação (posições, Xlimit, Ylimit, critério)
//Segmentos – array com o tempo de entrada e tempo de saída
//tempoD – tempo dispendido na região
para i=1 até tamanho_posições
    B(i)=verifica_posições (posições(i), critério);
Center=find(B==critério)
Para i=1 até tamanho_Center
    Se i=1
        C=Center(1);
    Senão
        Se i=tamanho_Center
            BI=Time(C);
            BE=Time(Center(s));
            Se (Center(i)-Center(i-1))≠1
                BI=Time(C); //tempo de entrada
                BE=Time(Center(i-1)); //tempo de saída
                C=center(i);
                Segmentos=[BI,BE]; //juntar no vector dos segmentos
            Se i=tamanho_Center
                BI=Time(C);
                BE=Time(Center(s));
                Segmentos=[BI,BE];
        Senão
            Se i=tamanho_Center
                BI=Time(C);
                BE=Time(Center(s));
                Segmentos=[BI,BE];

TempoD=FunçãoContar (Segmentos); //função que conta o tempo em cada segmento
```

Figura 41: Algoritmo utilizado para a segmentação automática de cada vector de posições (x,y) do *tracking*

1.4 Algoritmo para classificação de cruzamentos no OF

O algoritmo implementado para a classificação do tipo de cruzamentos encontrados no OF encontra-se representado na Figura 42.

```

C=cruzamentosOpenField(posição1,posição2,Xlimit,Ylimit)
//recebe duas posições seguidas do tracking e os limites calculados do OF
//C=0 – cruzamento na periferia
//C=1 – cruzamento no centro
C=0;
B1=Verificacentro(posição1); //0 se centro, 1 se periferia
B2= Verificacentro(posição2);
Se B1=B2
    Se B1=1 //Centro
        Cr1=QuadradosCentro(posição1) //número do quadrado
        Cr2=QuadradosCentro(posição2)
        Se Cr1=Cr2
            C=2;
        Se Cr1≠Cr2
            C=0;
    Se B1=0 //Periferia
        Cr1=QuadradosPeriferia(posição1) //número do quadrado
        Cr2=QuadradosPeriferia(posição2)
        Se Cr1=Cr2
            C=2;
        Se Cr1≠Cr2
            C=1;
Se B1≠B2
    B=B2-B1
    Se B=1
        C=0;
    Se B=0
        C=1;

```

Figura 42: Algoritmo implementado para verificação dos cruzamentos/ entradas nas diferentes regiões do OF

1.5 Algoritmo para classificação de cruzamentos no EPM

O algoritmo implementado para a classificação do tipo de cruzamentos encontrados no EPM encontra-se representado na Figura 43.

```

C = CruzamentosEPM (posições1, posições2, Xlimit, Ylimit)
//C=1 – nada
//C=2 – cruzamento para os braços fechados
//C=3 - cruzamento para os braços abertos
C=0;
B1=Verifica_Região_EPM (posições1,Xlimit,Ylimit);
//verifica a região do EPM
B2= Verifica_Região_EPM (posições2,Xlimit,Ylimit);

Se B2==B1
    C=1;
Se B2≠B1
    Se B2-B1=1
        C=2;
    Se B2-B1=2
        C=3;

```

Figura 43: Algoritmo implementado para verificação dos cruzamentos/ entradas nas diferentes regiões do EPM

ANEXO 2

CHRONIC UNPREDICTABLE STRESS PROTOCOL AND RECORDING PROTOCOL FOR LOCAL FIELD POTENTIAL LONGITUDINAL STUDY

1. OBJECTIVE

The Chronic Unpredictable Stress (CUS) protocol is a standardized protocol to induce a state of chronic stress in rats and mice. The main emphasis is on the unpredictability of the stressors used. Chronic stress is known to induce behavioural changes in humans and rodents manifested as learning and memory impairments paralleled by neuronal re-organization of the main brain regions involved in the stress response, most notoriously, the hippocampus and the pre-frontal cortex (PFC).

2. BEFORE YOU START

Material requirements

1. A hair drier.
2. Restrainers (there are commercially available ones for rats and for mice, but we use plastic flasks with cover, with approx. height of 20cm and 10cm of diameter).
3. Plastic bags (heavy-duty general-purpose black plastic bags)
4. A metallirod

3. PROTOCOL

General experimental procedures

STRESS

Animals are single-housed. Environmental enrichment is not used.

Animals are submitted to one stressor every day, during 21 days (3 weeks).

Stressors are presented in pseudorandom order according to the following table or a similar scheme.

Stressors are presented at different times of the day. Avoid inducing stress always at the same hour, especially in the end of the day (1h before lights off – 1h after lights off). The hour at which each stressor is applied is randomly set except for the days when the Stress group animals are recorded from. On these days, the stressor is applied after the recording takes place (preferably before the lights out period).

Table 2: CUS Calendar

DAY	HOUR	Stress	DAY	HOUR	Stress
1	12:00	Noise	25	8:00	Noise
2	8:00	Cold Air	26	11:00	Cold Air
3	9:00	Restraint	27	16:00	Restraint + Noise
4	11:00	Shaking	28	17:00	Noise
5	15:00	Cold Air	29	11:00	Restraint
6	12:00	Shaking	30	8:00	Cold Air + Noise
7	14:00	Restraint	18	16:00	Restraint
8	13:00	Noise	19	11:00	Noise
9	17:00	Cold Air	20	12:00	Shaking
10	13:00	Shaking	21	17:00	Cold Air + Restraint
11	17:00	Restraint			

RECORDING

Preceding the recording protocol the animals will have one week of habituation to the recording room and protocol procedures.

Animals will be recorded from twice a day: in a morning period (9:00-12:00) and in an afternoon period (17:00-20:00) corresponding to the daily corticosterone valley and peak periods respectively.

Stress group animals will be recorded on Mondays and Thursdays and Control group animals will be recorded on Tuesdays and Fridays. There will be no recordings on Wednesdays and on the Weekends.

Following the stress protocol period the animals will be subjected to an array of behavioral tests. They will be recorded from during the tests' performance.

Table 3: Recording Calendar

DAY	HOUR	Stress	DAY	HOUR	Stress
1		Stress	22		Blood sampling
2		Control	23		Rest
3			24		OF + EPM
4		Stress	25		Food deprivation 1
5		Control	26		Food deprivation 2

6			27		Food deprivation 3
7			28		T-Maze hab + FD 4
8		Stress	29		T- Maze 1
9		Control	30		T- Maze 2
10			31		T- Maze 3
11		Stress	32		T- Maze 4
12		Control	33		T- Maze 5 + HB habit
13			34		HB 1
14			35		HB 2
15		Stress	36		HB 3
16		Control	37		HB 4
17			38		HB 5
18		Stress	39		sacrifice
19		Control			

Description of each stressor

Shaking

Place one animal inside a plastic bag (we use a smaller bag for 6/8 animals, a bigger one for 10 or even 20 at the same time) and shake and twist the bag. Keep doing this for 20 min. From time to time open the bag completely to allow the entrance of fresh air.

Restraint

Place the animal inside the restrainer or the plastic flask (with holes) and close. Wait for 1h. Put the animals back.

Hair drier

Leave the animals in their home cages but remove the covers. Direct the cold air stream to the cage bed. When doing in several cages at the same time, spend 1 min in each cage and repeat serially until 20min have elapsed.

Noise

Use a metallic rod and rub it and tap it against the metallic lid of the cages or other metallic structures in the room.

ANEXO 3

3.1 Gráficos Correspondentes aos Segmentos da Periferia do OF

Os Gráficos das Figuras 44, 45, 46, e 47 referem-se ao calculo de espectros de potencia e de coerências nos segmentos da periferia do OF.

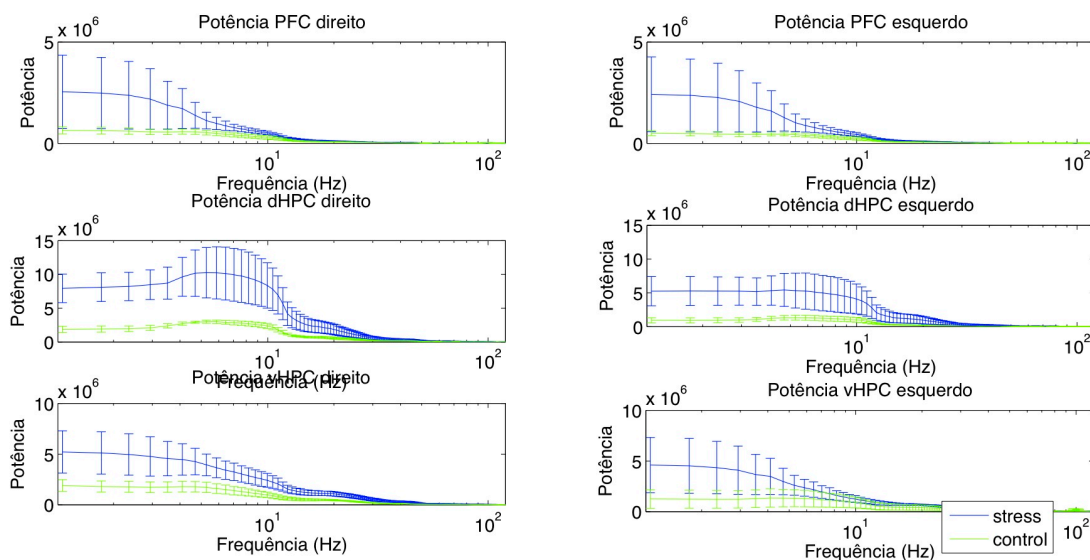


Figura 44: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo do espectro de potência nos segmentos da periferia do OF nas regiões: a) PFC direito, b) dHPC direito, c) vHPC direito, d) PFC esquerdo, e) dHPC e f) vHPC esquerdo, em que a linha azul representa a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e a linha verde representa a média do grupo de controlo (3 animais).

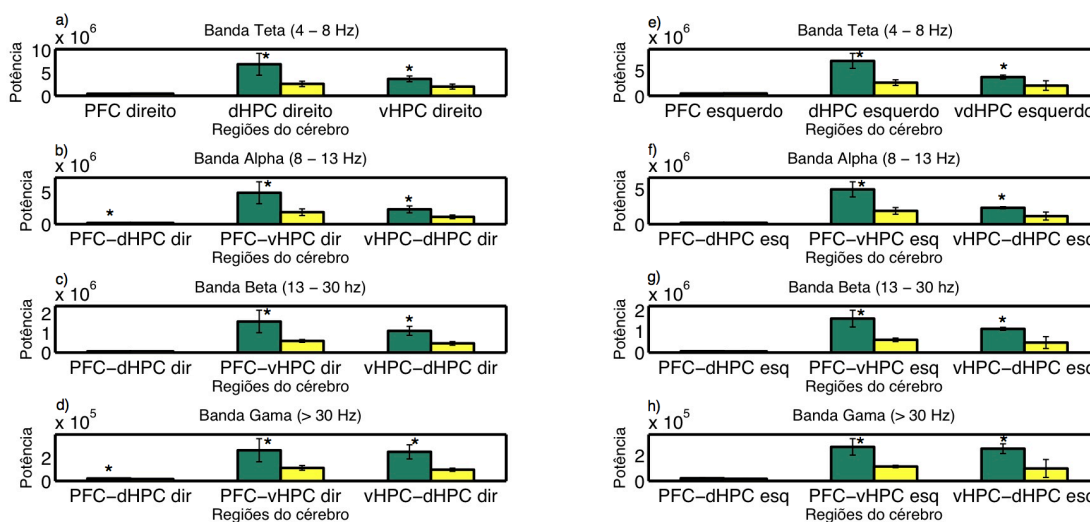


Figura 45: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo dos espectros de potência para todas as regiões cerebrais nos segmentos da periferia do OF seleccionados automaticamente nas bandas de frequência: a e e) Teta (4 – 8 Hz), b e f) Alfa (9 – 13 Hz), c e g) Beta (13 – 30 Hz) e d e h) Gama (>30 Hz) para os hemisférios direito do cérebro e esquerdo do cérebro em que as barras verdes representam a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e as barras amarelas representam a média do grupo de controlo (3 animais).

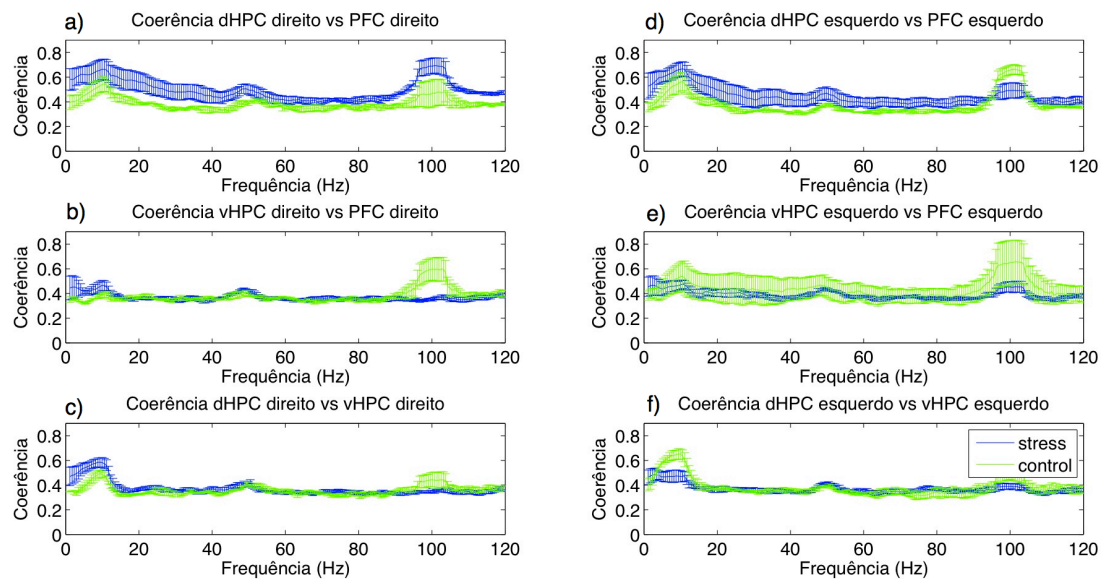


Figura 46: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo da coerência nos segmentos da periferia do OF entre: a) dHPC direito – PFC direito, b) vHPC direito – PFC direito, c) dHPC direito – vHPC direito, d) dHPC esquerdo – PFC esquerdo, e) vHPC esquerdo – PFC esquerdo e f) dHPC esquerdo – vHPC esquerdo, em que a linha azul representa a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e a linha verde representa a média do grupo de controlo (3 animais).

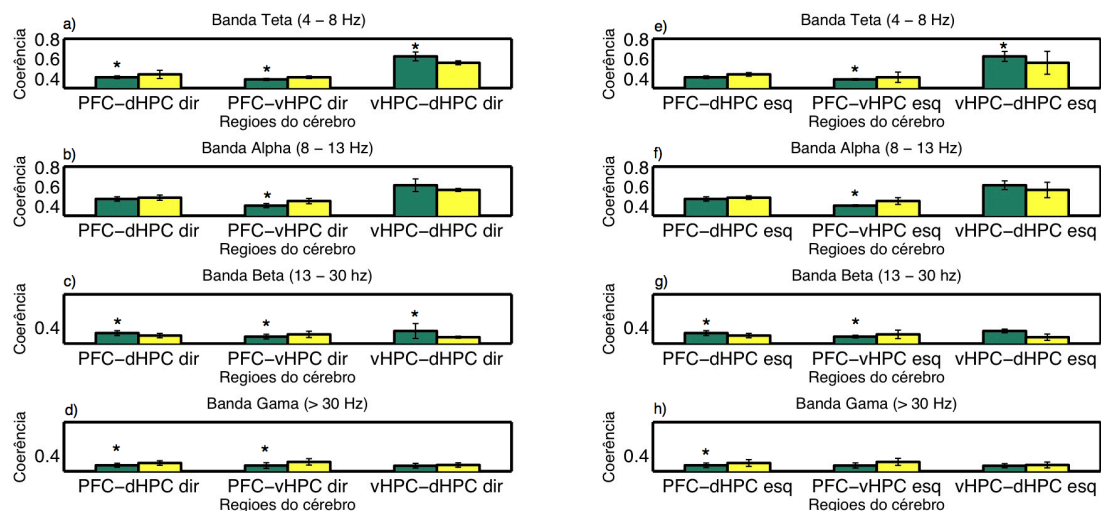


Figura 46: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo das coerências para todas as combinações de regiões cerebrais nos segmentos da periferia do OF obtidos de forma automática nas bandas de frequência: a e e) Teta (4 – 8 Hz), b e f) Alfa (9 – 13 Hz), c e g) Beta (13 – 30 Hz) e d e h) Gama (>30 Hz) para os hemisférios direito do cérebro e esquerdo do cérebro em que as barras verdes representam a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e as barras amarelas representam a média do grupo de controlo (3 animais).

3.2 Gráficos Correspondentes aos Segmentos do Centro do EPM

Os Gráficos das Figuras 47, 48, 49, e 50 referem-se ao cálculo de espectros de potencia e de coerências nos segmentos do centro do EPM.

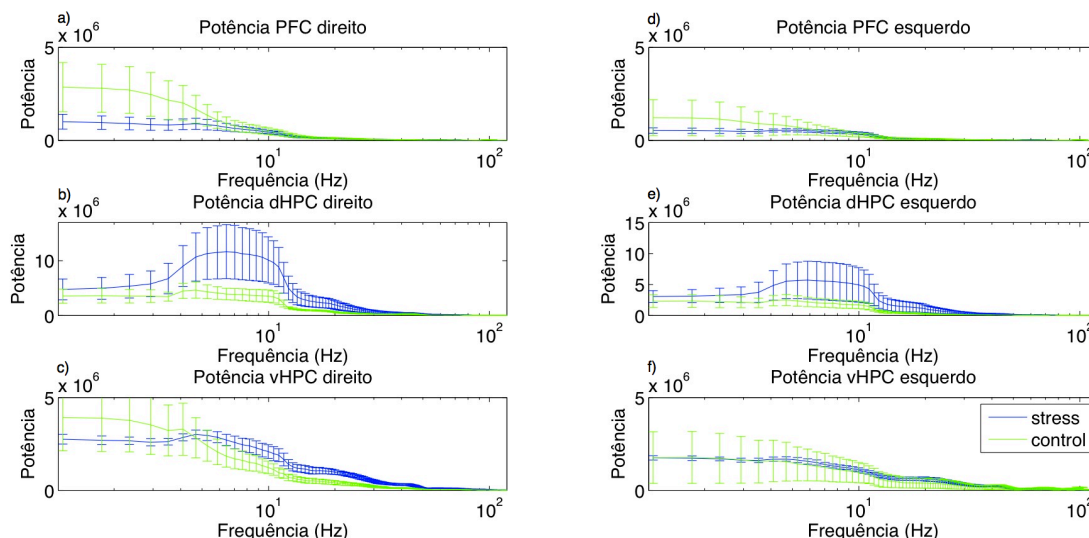


Figura 47: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo do espectro de potência nos segmentos do centro do EPM nas regiões: a) PFC direito, b) dHPC direito, c) vHPC direito, d) PFC esquerdo, e) dHPC e f) vHPC esquerdo, em que a linha azul representa a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e a linha verde representa a média do grupo de controlo (3 animais).

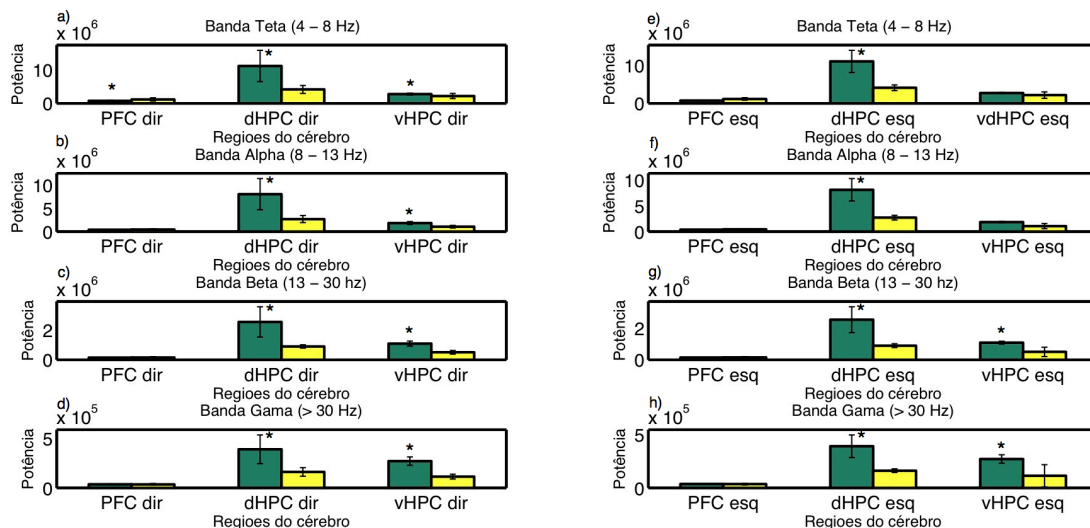


Figura 48: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo dos espectros de potência para todas as regiões cerebrais nos segmentos do centro do EPM seleccionados automaticamente nas bandas de frequência: a e e) Teta (4 – 8 Hz), b e f) Alfa (9 – 13 Hz), c e g) Beta (13 – 30 Hz) e d e h) Gama (>30 Hz) para os hemisférios direito do cérebro e esquerdo do cérebro em que as barras verdes representam a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e as barras amarelas representam a média do grupo de controlo (3 animais).

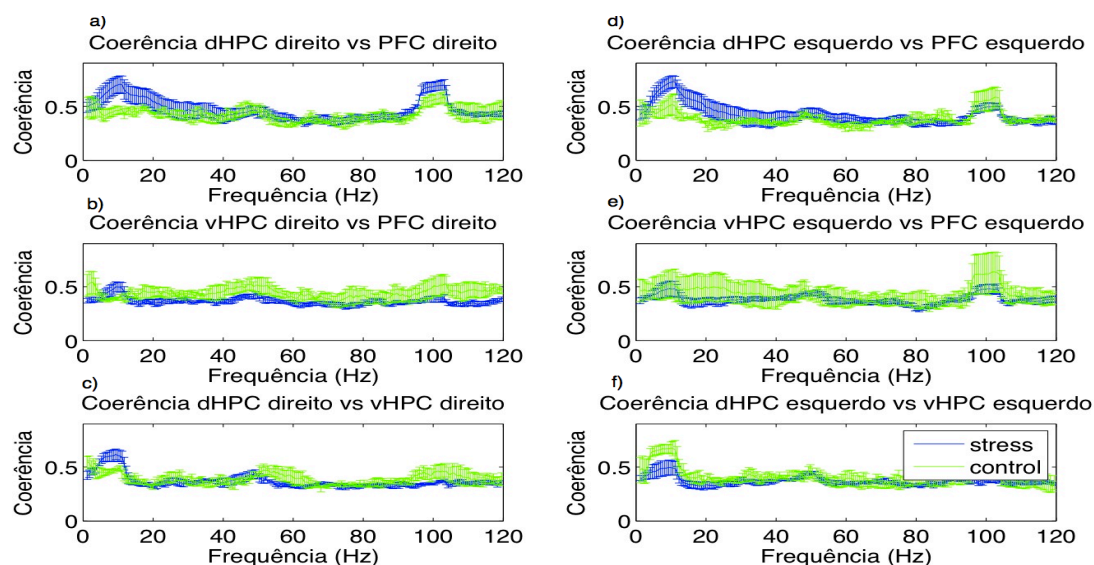


Figura 49: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo da coerência nos segmentos do centro do EPM entre: a) dHPC direito - PFC direito, b) vHPC direito - PFC direito, c) dHPC direito - vHPC direito, d) dHPC esquerdo - PFC esquerdo, e) vHPC esquerdo - PFC esquerdo e f) dHPC esquerdo - vHPC esquerdo, em que a linha azul representa a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e a linha verde representa a média do grupo de controlo (3 animais).

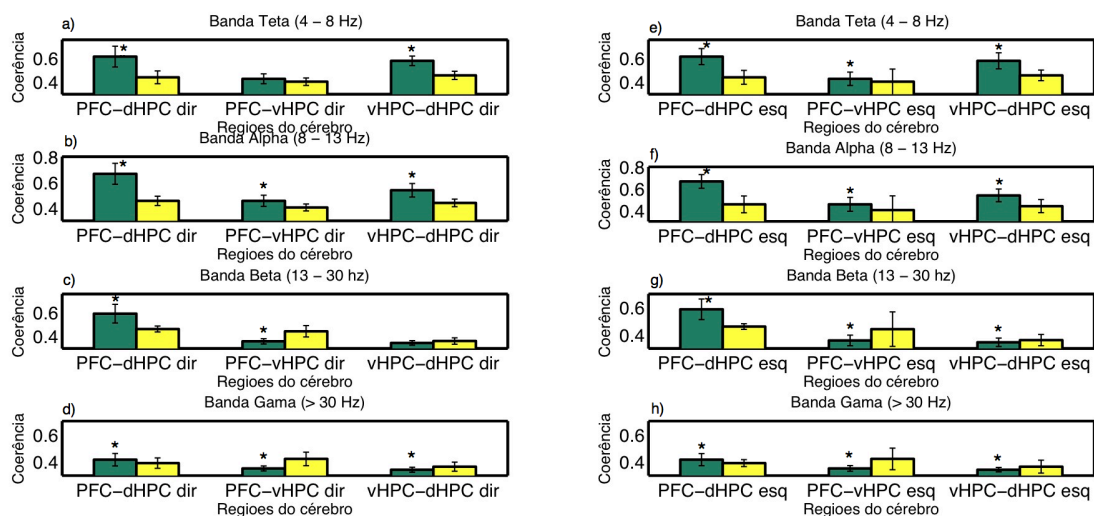


Figura 50: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo das coerências para todas as combinações de regiões cerebrais nos segmentos do centro do EPM obtidos de forma automática nas bandas de frequência: a e e) Teta (4 - 8 Hz), b e f) Alfa (9 - 13 Hz), c e g) Beta (13 - 30 Hz) e d e h) Gama (>30 Hz) para os hemisférios direito do cérebro e esquerdo em que as barras verdes representam a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e as barras amarelas representam a média do grupo de controlo (3 animais).

3.3 Gráficos Correspondentes aos Segmentos dos braços abertos do EPM

Os Gráficos das Figuras 51, 52, 53, e 54 referem-se ao calculo de espectros de potencia e de coerências nos segmentos dos braços abertos do EPM.

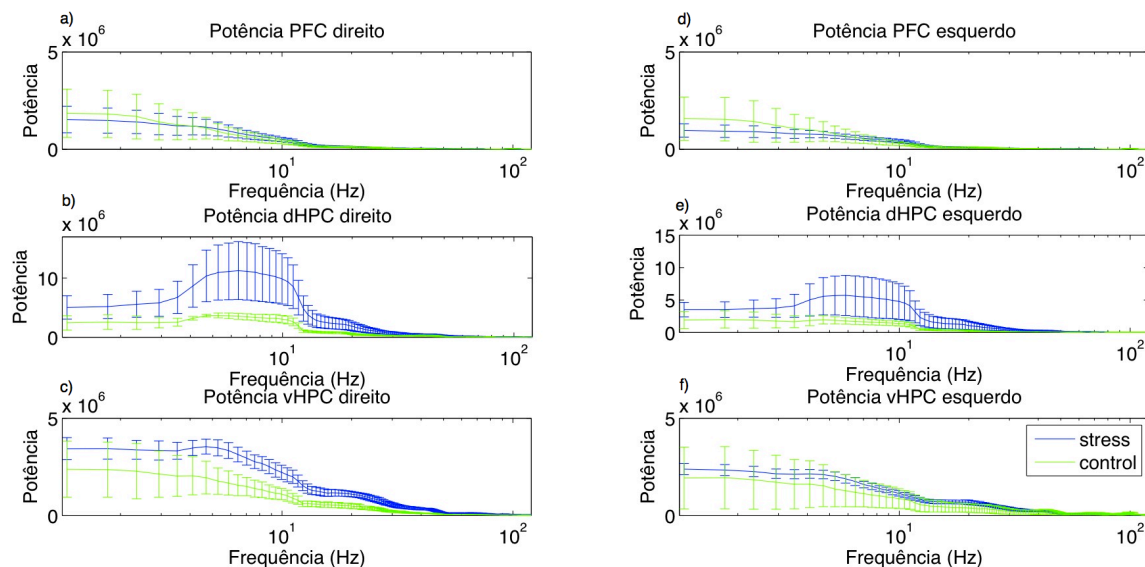


Figura 51: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo do espectro de potência nos segmentos dos braços abertos do EPM nas regiões: a) PFC direito, b) dHPC direito, c) vHPC direito, d) PFC esquerdo, e) dHPC e f) vHPC esquerdo, em que a linha azul representa a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e a linha verde representa a média do grupo de controlo (3 animais).

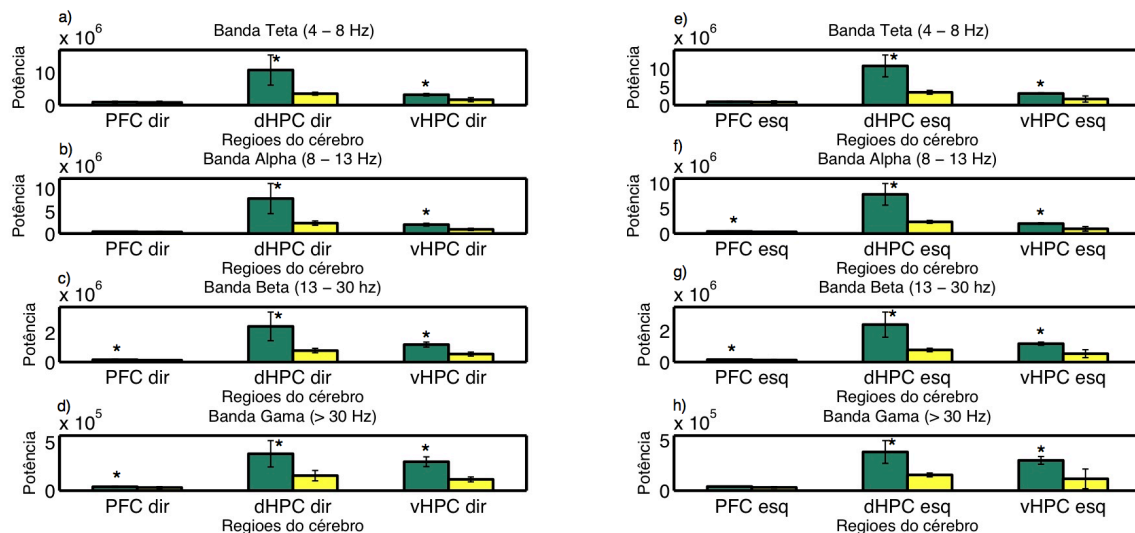


Figura 52: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo dos espectros de potência para todas as regiões cerebrais nos segmentos dos braços abertos do EPM seleccionados automaticamente nas bandas de frequência: a e e) Teta (4 – 8 Hz), b e f) Alfa (9 – 13 Hz), c e g) Beta (13 – 30 Hz) e d e h) Gama (>30 Hz) para os hemisférios direito do cérebro e esquerdo do cérebro em que as barras verdes representam a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e as barras amarelas representam a média do grupo de controlo (3 animais).

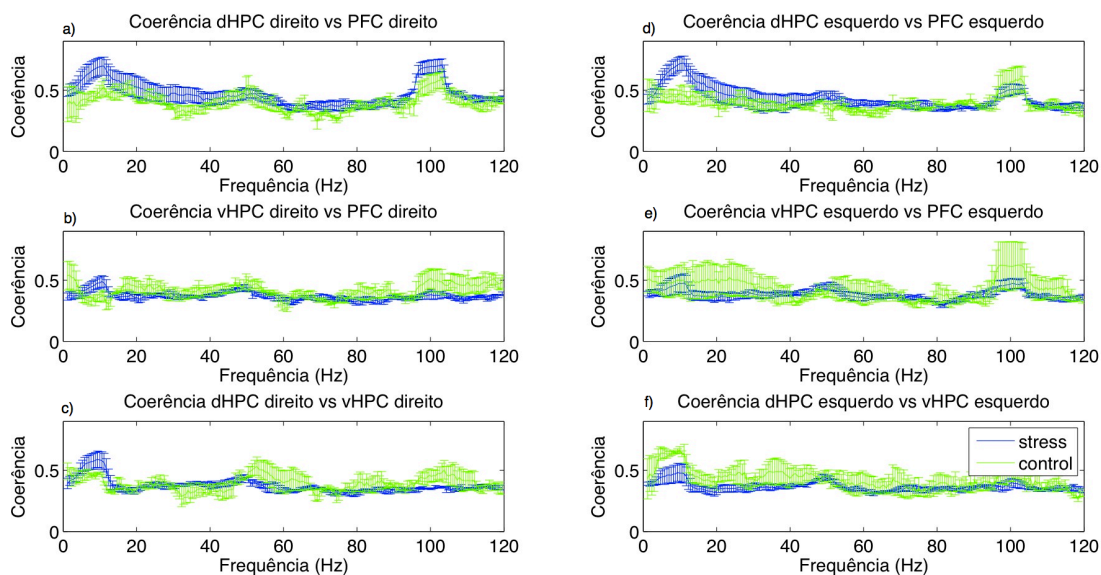


Figura 53: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo da coerência nos segmentos dos braços abertos do EPM entre: a) dHPC direito - PFC direito, b) vHPC direito - PFC direito, c) dHPC direito - vHPC direito, d) dHPC esquerdo - PFC esquerdo, e) vHPC esquerdo - PFC esquerdo e f) dHPC esquerdo - vHPC esquerdo, em que a linha azul representa a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e a linha verde representa a média do grupo de controlo (3 animais).

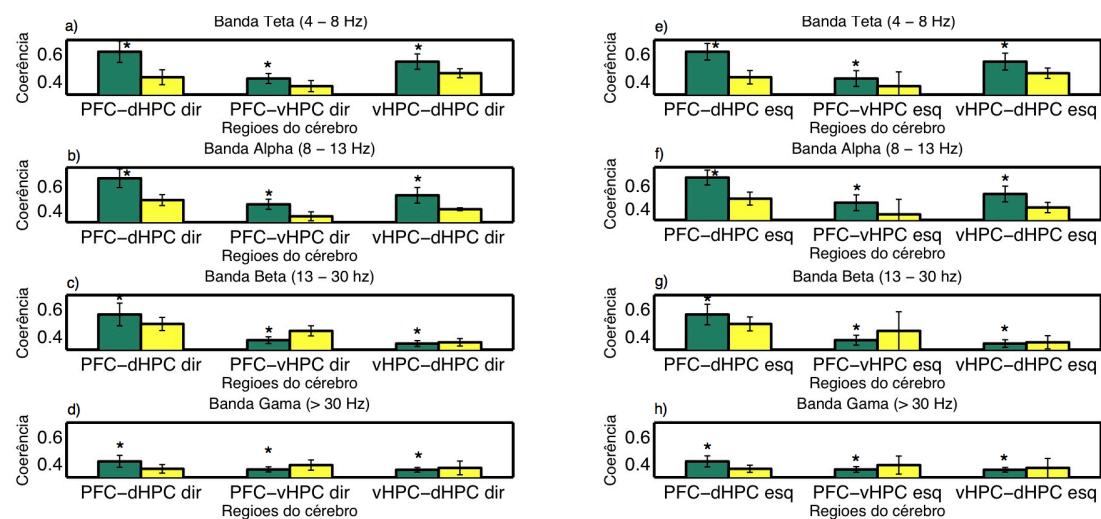


Figura 54: Representação dos gráficos obtidos para o cálculo das coerências para todas as combinações de regiões cerebrais nos segmentos dos braços abertos do EPM obtidos de forma automática nas bandas de frequência: a e e) Teta (4 - 8 Hz), b e f) Alfa (9 - 13 Hz), c e g) Beta (13 - 30 Hz) e d e h) Gama (>30 Hz) para os hemisférios direito do cérebro e esquerdo do cérebro em que as barras verdes representam a média do grupo dos animais sujeitos a CUS (4 animais) e as barras amarelas representam a média do grupo de controlo (3 animais).